

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

Date of mailing (day/month/year)
06 April 2000 (06.04.00)

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

International application No.
PCT/EP99/06317

Applicant's or agent's file reference
19134P WO

International filing date (day/month/year)
27 August 1999 (27.08.99)

Priority date (day/month/year)
28 August 1998 (28.08.98)

Applicant

STÄHLER, Cord, F. et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

 in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

01 March 2000 (01.03.00)

 in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election was was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

G. Bähr

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

59/763914
Translation
500

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

5

Applicant's or agent's file reference 19134P WO	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP99/06317	International filing date (day/month/year) 27 August 1999 (27.08.99)	Priority date (day/month/year) 28 August 1998 (28.08.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC B01J 19/00		
Applicant FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 6 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 01 March 2000 (01.03.00)	Date of completion of this report 13 December 2000 (13.12.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/06317

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- the international application as originally filed.
- the description, pages 1-46, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-33, filed with the letter of 04 December 2000 (04.12.2000),
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- the drawings, sheets/fig 1-4, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- the description, pages _____
 the claims, Nos. _____
 the drawings, sheets/fig _____

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/06317

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-33	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-33	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-33	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. This report makes reference to the following documents:

D1 US-A-5723320
 D2 US-A-5755942
 D3 US-A-5677195
 D4 WO-A-96/10747.

2. The method for producing a carrier according to Claim 1 of the application differs from the one in D1 or D3 in that in D1 or D3 the receptors are not in ducts inside the carrier, see D1: Figure 1; column 5, line 53 to column 6, line 23 and D3: column 2, lines 32 to 62; column 7, lines 43 to 49.

The method for integrated synthesis and analyte determination according to Claim 12 of the application differs from the one in D4 in that D4 does not disclose the parts (b) and (c) of Claim 12, see D4: Figure 1; page 15, line 8 to page 18, line 20; Claim 1.

Claims 1 to 33 therefore meet the requirements of PCT Article 33(2) (novelty).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/EP 99/06317

It is plausible that the claimed method makes analysis more simple and economical.

The current Claims 1 to 33 therefore meet the requirements of PCT Article 33(3) (inventive step).

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

Weickmann Weickmann Prechtel Weiss
Tiesmeyer Herzog Böhm Liska & Huber
Kopernikusstrasse 9
81679 München
ALLEMAGNE

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum (Tag/Monat/Jahr)	13.12.2000
----------------------------------	------------

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 19134P WO	WICHTIGE MITTEILUNG	
--	---------------------	--

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/06317	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/08/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 28/08/1998
--	---	--

Anmelder FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY GMBH et al.

- Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
- Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
- Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Michaleczek, N
--	---

Tel. +49 89 2399-7254



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 19134P WO	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/06317	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 27/08/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 28/08/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK B01J19/00		
Anmelder FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY GMBH et al.		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</p>		

Datum der Einreichung des Antrags 01/03/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 13.12.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Van Iddekinge, R Tel. Nr. +49 89 2399 8346



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/06317

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-46 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-33 eingegangen am 04/12/2000 mit Schreiben vom 04/12/2000

Zeichnungen, Blätter:

1-4 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/06317

- Beschreibung, Seiten:
 Ansprüche, Nr.:
 Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-33
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-33
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-33
	Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- 1). Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1=US-A-5723320

D2=US-A-5755942

D3=US-A-5677195

D4=WO-A-96/10747

- 2). Das Verfahren zur Herstellung eines Trägers gemäß Anspruch 1 der Anmeldung unterscheidet sich von dem aus D1 oder D3 dadurch, daß sich in D1 oder D3 die Rezeptoren nicht in Kanälen im Inneren des Trägers befinden, siehe D1: Figur 1; Spalte 5, Zeile 53-Spalte 6, Zeile 23 und D3: Spalte 2, Zeilen 32-62; Spalte 7, Zeilen 43-49.

Das Verfahren zur integrierten Synthese und Analytbestimmung gemäß Anspruch 12 der Anmeldung unterscheidet sich von dem aus D4 dadurch, daß D4 nicht die Teile (b) und (c) des Anspruchs 12 offenbart, siehe D4: Figur 1; Seite 15, Zeile 8- Seite 18, Zeile 20; Anspruch 1.

Deshalb erfüllen die Ansprüche 1 - 33 die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT (Neuheit).

Es ist glaubhaft, daß das beanspruchte Verfahren eine einfachere und kostengünstigere Analyse ermöglicht.

Die geltenden Patentansprüche 1 bis 33 erfüllen daher die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT (erforderischer Tätigkeit).

04. Dez. 2000

- 46 -

Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Trägers für die Bestimmung von Analyten, umfassend die Schritte
 - (a) Bereitstellen eines Trägers umfassend mindestens einen geschlossenen Kanal im Trägerkörper,
 - (b) Leiten von Flüssigkeit mit Bausteinen für die Synthese polymerer Rezeptoren durch den Kanal oder die Kanäle des Trägerkörpers,
 - (c) orts- oder/und zeitspezifisches Immobilisieren der Rezeptorbausteine an jeweils vorbestimmten Positionen in dem Kanal oder in den Kanälen durch Belichten und
 - (d) Wiederholen der Schritte (b) und (c) bis die gewünschten Rezeptoren an den jeweils vorbestimmten Positionen synthetisiert worden sind.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen Träger herstellt, der definierte Flächenbereiche mit jeweils gleichen Rezeptorspezies enthält.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Kanäle auf mindestens einer Trägeroberfläche angeordnet sind.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Träger eine Vielzahl von Kanälen enthält, die vorzugsweise parallel zueinander angeordnet sind.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,

- 47 -

daß die Rezeptoren aus Nukleinsäuren und Nukleinsäureanaloga ausgewählt werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Rezeptorbausteine aus Nukleotiden, Oligonukleotiden, Nukleotidanaloga und Oligonukleotidanaloga ausgewählt werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Rezeptoren aus Polypeptiden ausgewählt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Rezeptorbausteine aus Aminosäuren und Peptiden ausgewählt werden.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß Belichten über eine programmierbare Lichtquellenmatrix erfolgt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Muster der polymeren Rezeptoren durch eine Computerprogrammierung festgelegt wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man den Träger zur Bestimmung von Analyten in einer Probe verwendet.

- 48 -

12. Verfahren zur integrierten Synthese und Analytbestimmung an einem Träger umfassend die Schritte:
 - (a) Bereitstellen eines Trägerkörpers,
 - (b) Leiten einer Flüssigkeit mit darin enthaltenen Rezeptoren oder Bausteinen für die Synthese von polymeren Rezeptoren über den Träger,
 - (c) orts- oder/und zeitspezifisches Immobilisieren der Rezeptoren oder Rezeptorbausteine an jeweils vorbestimmten Positionen auf dem Träger, wobei die Synthese und Analytbestimmung in einer integrierten Vorrichtung durchgeführt wird, wobei der Synthesee- oder/und der Analytbestimmungsprozeß in einer beliebigen Anzahl von Positionen auf dem Träger überwacht und geregelt wird,
 - (d) gegebenenfalls Wiederholen der Schritte (b) und (c) bis die gewünschten Rezeptoren an den jeweils vorbestimmten Positionen auf dem Träger synthetisiert worden sind,
 - (e) Inkontaktbringen des Trägers mit einer Analyten enthaltenden Probe und
 - (f) Bestimmen der Analyten über deren Bindung an die auf dem Träger immobilisierten Rezeptoren.
13. Verfahren nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine integrierte Vorrichtung verwendet, umfassend eine programmierbare Lichtquellenmatrix, eine Detektormatrix, einen zwischen Lichtquellen - und Detektormatrix angeordneten Träger sowie Mittel zur Zufuhr von Fluids in den Träger und zur Ableitung von Fluids aus dem Träger.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 oder 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß nach der Bestimmung der Analyt wieder vom Träger entfernt wird.

- 49 -

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß mehrere Synthese/Analytbestimmungszyklen durchgeführt werden,
wobei die Rezeptoren für einen nachfolgenden Zyklus auf Basis der
Informationen aus einem vorhergehenden Zyklus synthetisiert werden.
16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß für den nachfolgenden Zyklus einer Verlängerung der Rezeptoren
aus dem vorhergehenden Zyklus erfolgt.
17. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß für den nachfolgenden Zyklus ein neuer Träger mit gegenüber dem
vorhergehenden Zyklus modifizierten Rezeptoren synthetisiert wird.
18. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Modifizierung der Rezeptoren eine Änderung der Sequenz
oder/und einen Ausschluß negativer Rezeptoren des vorhergehenden
Zyklus umfaßt.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen planaren Träger verwendet.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen Träger mit einer Vielzahl von Kanälen verwendet.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,

- 50 -

daß für einen Synthese/Analytbestimmungszyklus mehrere Träger verwendet werden.

22. Verfahren nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß die mehreren Träger in unterschiedlichen Detektionsvorrichtungen synthetisiert und analysiert werden, die informationstechnisch miteinander verknüpft sind, jedoch voneinander räumlich getrennt sein können.
23. Verfahren nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen Träger, umfassend eine Vielzahl von Kanälen, wobei in den Kanälen eine Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptoren immobilisiert ist, verwendet.
24. Verfahren nach Anspruch 23,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Träger zumindest im Bereich der Reaktionsbereiche optisch transparent ist.
25. Verfahren nach Anspruch 23 oder 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein Reagenzienkit, umfassend den Träger und Bausteine für die Synthese polymerer Rezeptoren auf dem Träger eingesetzt wird.
26. Verfahren nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Vorrichtung weiterhin Mittel zur Entschützung von Reaktionskomponenten auf den Träger umfaßt.
27. Verfahren nach Anspruch 13 oder 26,

- 51 -

dadurch gekennzeichnet,

daß die Vorrichtung weiterhin elektronische Steuerungs- und Regelungsmittel umfaßt.

28. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 27 zur Sequenzierung von Nukleinsäuren.
29. Verwendung nach Anspruch 28 zur Neusequenzierung oder/und Resequenzierung von komplexen genetischem Material, wie etwa individueller Genome oder synthetischen Nukleinsäuren.
30. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 27 zur Gewinnung diagnostischer Informationen für die individuelle Patientenversorgung wie etwa die individuelle Wirkung von Pharmaka.
31. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 27 zur Wirkungsanalyse pharmakologischer Substanzen.
32. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 27 zur Erstellung und Analyse von Substanzbibliotheken.
33. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 27 zum Vergleich von Individuen in einer Population.

- 47 -

Claims

**REPLACED BY
ART 34 AMDT**

1. A method for producing a support for determining analytes, comprising the steps of
 - 5 (a) providing a support body comprising at least one channel,
 - (b) passing liquid with building blocks for synthesizing polymeric receptors through the channel or channels of the support body,
 - 10 (c) site- or/and time-specifically immobilizing the receptor building blocks in each case on predetermined positions in the channel or channels and
 - (d) repeating steps (b) and (c) until the required receptors have been synthesized in each case on the predetermined positions.
2. The method as claimed in claim 1, characterized in that a support which comprises defined area regions with, in each case, identical receptor species is produced.
- 20 3. The method as claimed in claim 1 or 2, characterized in that the channels are arranged on at least one support surface.
- 25 4. The method as claimed in any of claims 1 to 3, characterized in that the support comprises a large number of channels which are preferably arranged parallel to one another.
- 30 5. The method as claimed in any of claims 1 to 4, characterized in that the receptors are selected from nucleic acids and nucleic acid analogs.
- 35 6. The method as claimed in claim 5, characterized in that the receptor building blocks are selected from nucleotides, oligonucleotides, nucleotide

analogs and oligonucleotide analogs.

7. The method as claimed in any of claims 1 to 4, characterized in that the receptors are selected from polypeptides.
8. The method as claimed in claim 7, characterized in that the receptor building blocks are selected from amino acids and peptides.
- 10 9. The method as claimed in any of claims 1 to 7, characterized in that the site- or/and time-specific immobilization of the receptor building blocks takes place by illumination.
- 15 10. The method as claimed in claim 9, characterized in that the illumination takes place via a programmable light source matrix.
- 20 11. The method as claimed in any of claims 1 to 8, characterized in that the site- or/and time-specific immobilization of the receptor building blocks takes place by wetting with an activating fluid with controllable selection of the activated positions.
- 25 12. The method as claimed in any of claims 1 to 11, characterized in that the pattern of polymeric receptors is fixed by computer programming.
- 30 13. The method as claimed in any of claims 1 to 12, characterized in that the support is used for determining analytes in a sample.
- 35 14. A method for integrated synthesis and analyte determination on a support, comprising the steps of:
 - (a) providing a support body,

- (b) passing a liquid with, present therein, receptors or building blocks for synthesizing polymeric receptors over the support,
 - 5 (c) site- or/and time-specifically immobilizing the receptors or receptor building blocks in each case on predetermined positions on the support,
 - 10 (d) where appropriate repeating steps (b) and (c) until the required receptors have been synthesized in each case on the predetermined positions on the support,
 - (e) bringing the support into contact with a sample containing analytes and
 - 15 (f) determining the analytes via their binding to the receptors immobilized on the support.
15. The method as claimed in claim 14, characterized in that the synthesis and analyte determination is carried out in an integrated apparatus, with the 20 synthesis or/and the analyte determination process being monitored and controlled in any number of positions on the support.
25. The method as claimed in claim 15, characterized in that an integrated apparatus comprising a programmable light source matrix, a detector matrix, a support arranged between light source matrix and detector matrix, and means for supplying fluids into the support and for discharging fluids from the support is used.
30. The method as claimed in any of claims 14 to 16, characterized in that the analyte is removed again from the support after the determination.
35. The method as claimed in any of claims 14 to 17, characterized in that a plurality of synthesis/analyte determination cycles is carried out, with the receptors for a subsequent cycle being

synthesized on the basis of the information from a preceding cycle.

19. The method as claimed in claim 18, characterized
5 in that an extension of the receptors from the preceding cycle takes place for the subsequent cycle.
20. The method as claimed in claim 18, characterized
10 in that a new support with receptors which are modified compared with the preceding cycle is synthesized for the subsequent cycle.
21. The method as claimed in claim 20, characterized
15 in that the modification of the receptors comprises a change in the sequence or/and an exclusion of negative receptors from the preceding cycle.
- 20 22. The method as claimed in any of claims 14 to 21, characterized in that a planar support is used.
23. The method as claimed in any of claims 14 to 21, characterized in that a support with a large
25 number of channels is used.
24. The method as claimed in any of claims 14 to 23, characterized in that a plurality of supports is used for a synthesis/analyte determination cycle.
30
25. The method as claimed in claim 24, characterized in that the plurality of supports is synthesized and analyzed in different detection apparatuses between which there are information technology links but which may be spatially separate from one
35 another.
26. A support for determining analytes comprising a large number of channels, in particular capillary

channels, a large number of different receptors being immobilized in the channels.

27. A support as claimed in claim 26, characterized in
5 that it is optically transparent at least in the region of the reaction regions.
28. A reagent kit comprising a support as claimed in
10 claim 26 or 27 and building blocks for synthesizing polymeric receptors on the support.
29. An apparatus for integrated synthesis and analyte determination on a support comprising a programmable light source matrix, a detector matrix, a support arranged between light source matrix and detector matrix, and means for supplying fluids into the support and for discharging fluids from the support.
15
- 20 30. An apparatus as claimed in claim 29 additionally comprising means for deprotection of reaction components on the support.
- 25 31. An apparatus as claimed in claim 29 or 30 additionally comprising electronic control means.
- 30 32. The use of the method as claimed in any of claims 1 to 25, of the support as claimed in claim 26 or 27, of the reagent kit as claimed in claim 28 or of the apparatus as claimed in any of claims 29 to 31 for determining an analyte in a sample.
- 35 33. The use as claimed in claim 32 for the sequencing of nucleic acids.
34. The use as claimed in claim 33 for new sequencing or/and resequencing of complex genetic material such as, for example, individual genomes or

synthetic nucleic acids.

35. The use as claimed in claim 32 for obtaining diagnostic information for individual patient management such as, for example, the individual effect of pharmaceuticals.
5
36. The use as claimed in claim 32 for analyzing the effect of pharmacological substances.
10
37. The use as claimed in claim 32 for setting up and analyzing substance libraries.
15
38. The use as claimed in claim 32 for comparing individuals in a population.

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



6. NOV. 2000

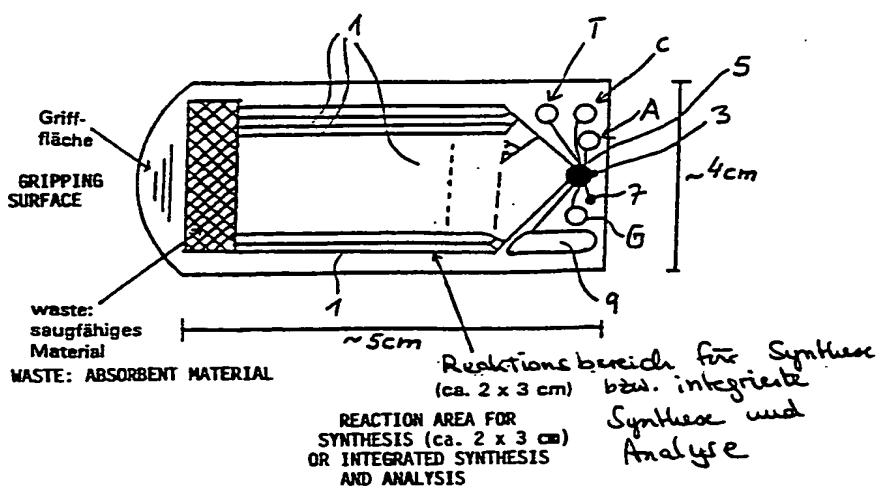
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7:	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/13018
B01J 19/00, C07H 21/00, C07K 1/04		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. März 2000 (09.03.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06317	(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 27. August 1999 (27.08.99)	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Prioritätsdaten: 198 39 256.7 28. August 1998 (28.08.98) DE 198 39 254.0 28. August 1998 (28.08.98) DE 198 39 255.9 28. August 1998 (28.08.98) DE 199 07 080.6 19. Februar 1999 (19.02.99) DE 199 24 327.1 27. Mai 1999 (27.05.99) DE	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Mit geänderten Ansprüchen.</i>
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Gäßelweg 15, D-69469 Weinheim (DE).	(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 14. September 2000 (14.09.00)
(72) Erfinder, und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): STÄHLER, Cord, F. [DE/DE]; Siegfriedstrasse 9, D-69469 Weinheim (DE). STÄHLER, Peer, F. [DE/DE]; Riedfeldstrasse 3, D-68169 Mannheim (DE). MÜLLER, Manfred [DE/DE]; Reuterstrasse 76/b, D-80689 München (DE). STÄHLER, Fritz [DE/DE]; Gäßelweg 15, D-69469 Weinheim (DE). LINDNER, Hans [DE/DE]; Vierreichweg 27, D-70569 Stuttgart (DE).	Veröffentlichungsdatum der geänderten Ansprüche: 26. Oktober 2000 (26.10.00)

(54) Title: SUPPORT FOR A METHOD FOR DETERMINING AN ANALYTE AND A METHOD FOR PRODUCING THE SUPPORT

(54) Bezeichnung: TRÄGER FÜR ANALYTBESTIMMUNGSVERFAHREN UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG DES TRÄGERS



(57) Abstract

The invention relates to a support (40) for a method for determining analytes comprising a multitude of channels (1), especially capillary channels. A multitude of different receptors is immobilized in the channels (1) by, in particular, exposure to light. The invention also relates to a method for producing such a support. The support (40) also preferably comprises reservoirs (T, G, A, C) for the individual feed materials, a gas inlet (3), a valve (5), a sample feed (7) and an entrance (9) for additional synthesis chemicals.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein Träger (40) für Analytbestimmungsverfahren angegeben, umfassend eine Vielzahl von Kanälen (1), insbesondere Kapillarkanälen, wobei in den Kanälen (1) eine Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptoren insbesondere durch Belichtung immobilisiert ist. Ferner wird ein Verfahren zur Herstellung eines solches Trägers beschrieben. Der Träger (40) umfasst vorzugsweise auch Reservoirs (T, G, A, C) für die einzelnen Einsatzstoffe, ein Gaseinlass (3), ein Ventil (5), eine Probeneingabe (7) und ein Zugang (9) für weitere Synthesechemikalien.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 9. Juni 2000 (09.06.00) eingegangen;
ursprüngliche Ansprüche 1-38 durch geänderte Ansprüche
1-38 ersetzt (7 Seiten)]

1. Verfahren zur Herstellung eines Trägers für die Bestimmung von Analyten, umfassend die Schritte
 - (a) Bereitstellen eines Trägerkörpers umfassend mindestens einen Kanal,
 - (b) Leiten von Flüssigkeit mit Bausteinen für die Synthese polymerer Rezeptoren durch den Kanal oder die Kanäle des Trägerkörpers,
 - (c) orts- oder/und zeitspezifisches Immobilisieren der Rezeptorbausteine an jeweils vorbestimmten Positionen in dem Kanal oder in den Kanälen und
 - (d) Wiederholen der Schritte (b) und (c) bis die gewünschten Rezeptoren an den jeweils vorbestimmten Positionen synthetisiert worden sind.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen Träger herstellt, der definierte Flächenbereiche mit jeweils gleichen Rezeptorspezies enthält.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Kanäle auf mindestens einer Trägeroberfläche angeordnet sind.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Träger eine Vielzahl von Kanälen enthält, die vorzugsweise parallel zueinander angeordnet sind.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,

GEÄNDERTES BLATT (ARTIKEL 19)

daß die Rezeptoren aus Nukleinsäuren und Nukleinsäureanaloga ausgewählt werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Rezeptorbausteine aus Nukleotiden, Oligonukleotiden, Nukleotidanaloga und Oligonukleotidanaloga ausgewählt werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Rezeptoren aus Polypeptiden ausgewählt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Rezeptorbausteine aus Aminosäuren und Peptiden ausgewählt werden.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß das orts- oder/und zeitspezifische Immobilisieren der Rezeptorbausteine durch Belichten erfolgt.
10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
das Belichten über eine programmierbare Lichtquellenmatrix erfolgt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß das orts- oder/und zeitspezifische Immobilisieren der Rezeptorbausteine durch Benetzung mit einem aktivierenden Fluid unter steuerbarer Auswahl der aktivierte Positionen erfolgt.

55

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Muster der polymeren Rezeptoren durch eine
Computerprogrammierung festgelegt wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß man den Träger zur Bestimmung von Analyten in einer Probe
verwendet.
14. Verfahren zur integrierten Synthese und Analytbestimmung an einem
Träger umfassend die Schritte:
 - (a) Bereitstellen eines Trägerkörpers,
 - (b) Leiten einer Flüssigkeit mit darin enthaltenen Rezeptoren oder
Bausteinen für die Synthese von polymeren Rezeptoren über den
Träger,
 - (c) orts- oder/und zeitspezifisches Immobilisieren der Rezeptoren
oder Rezeptorbausteine an jeweils vorbestimmten Positionen auf
dem Träger,
 - (d) gegebenenfalls Wiederholen der Schritte (b) und (c) bis die
gewünschten Rezeptoren an den jeweils vorbestimmten
Positionen auf dem Träger synthetisiert worden sind,
 - (e) Inkontaktbringen des Trägers mit einer Analyten enthaltenden
Probe und
 - (f) Bestimmen der Analyten über deren Bindung an die auf dem
Träger immobilisierten Rezeptoren.
15. Verfahren nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Synthese und Analytbestimmung in einer integrierten
Vorrichtung durchgeführt wird, wobei der Synthese- oder/und der

Analytbestimmungsprozeß in einer beliebigen Anzahl von Positionen auf dem Träger überwacht und geregelt wird.

16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine integrierte Vorrichtung verwendet, umfassend eine programmierbare Lichtquellenmatrix, eine Detektormatrix, einen zwischen Lichtquellen - und Detektormatrix angeordneten Träger sowie Mittel zur Zufuhr von Fluids in den Träger und zur Ableitung von Fluids aus dem Träger.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß nach der Bestimmung der Analyt wieder vom Träger entfernt wird.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß mehrere Synthese/Analytbestimmungszyklen durchgeführt werden, wobei die Rezeptoren für einen nachfolgenden Zyklus auf Basis der Informationen aus einem vorhergehenden Zyklus synthetisiert werden.
19. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß für den nachfolgenden Zyklus einer Verlängerung der Rezeptoren aus dem vorhergehenden Zyklus erfolgt.
20. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß für den nachfolgenden Zyklus ein neuer Träger mit gegenüber dem vorhergehenden Zyklus modifizierten Rezeptoren synthetisiert wird.

21. Verfahren nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Modifizierung der Rezeptoren eine Änderung der Sequenz
oder/und einen Ausschluß negativer Rezeptoren des vorhergehenden
Zyklus umfaßt.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen planaren Träger verwendet.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen Träger mit einer Vielzahl von Kanälen verwendet.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 23,
dadurch gekennzeichnet,
daß für einen Synthese/Analytbestimmungszyklus mehrere Träger
verwendet werden.
25. Verfahren nach Anspruch 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß die mehreren Träger in unterschiedlichen Detektionsvorrichtungen
synthetisiert und analysiert werden, die informationstechnisch
miteinander verknüpft sind, jedoch voneinander räumlich getrennt sein
können.
26. Verwendung eines Trägers, umfassend eine Vielzahl von Kanälen,
insbesondere Kapillarkanälen, wobei in den Kanälen eine Vielzahl von
unterschiedlichen Rezeptoren immobilisiert ist, für die Bestimmung von
Analyten in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 25.

27. Verwendung nach Anspruch 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Träger zumindest im Bereich der Reaktionsbereiche optisch transparent ist.
28. Verwendung eines Reagenzienkits umfassend einen Träger nach Anspruch 26 oder 27 und Bausteine für die Synthese polymerer Rezeptoren auf dem Träger in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 25.
29. Verwendung einer Vorrichtung zur integrierten Synthese und Analytbestimmung an einem Träger umfassend eine programmierbare Lichtquellenmatrix, eine Detektormatrix, einen zwischen Lichtquellen- und Detektormatix angeordneten Träger sowie Mittel zur Zufuhr von Fluids in den Träger und zur Ableitung von Fluids aus dem Träger in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 25.
30. Verwendung nach Anspruch 29,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Vorrichtung weiterhin Mittel zur Entschützung von Reaktionskomponenten auf den Träger umfaßt.
31. Verwendung nach Anspruch 29 oder 30,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Vorrichtung weiterhin elektronische Steuerungs- und Regelungsmittel umfaßt.
32. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 25, des Trägers nach Anspruch 26 oder 27, des Reagenzienkits nach Anspruch 28 oder der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 29 bis 31 zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe.

33. Verwendung nach Anspruch 32 zur Sequenzierung von Nukleinsäuren.
34. Verwendung nach Anspruch 33 zur Neusequenzierung oder/und Resequenzierung von komplexen genetischem Material, wie etwa individueller Genome oder synthetischen Nukleinsäuren.
35. Verwendung nach Anspruch 32 zur Gewinnung diagnostischer Informationen für die individuelle Patientenversorgung wie etwa die individuelle Wirkung von Pharmaka.
36. Verwendung nach Anspruch 32 zur Wirkungsanalyse pharmakologischer Substanzen.
37. Verwendung nach Anspruch 32 zur Erstellung und Analyse von Substanzbibliotheken.
38. Verwendung nach Anspruch 32 zum Vergleich von Individuen in einer Population.

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 33/53	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/13018 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. März 2000 (09.03.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06317		(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 27. August 1999 (27.08.99)		
(30) Prioritätsdaten: 198 39 256.7 28. August 1998 (28.08.98) DE 198 39 254.0 28. August 1998 (28.08.98) DE 198 39 255.9 28. August 1998 (28.08.98) DE 199 07 080.6 19. Februar 1999 (19.02.99) DE 199 24 327.1 27. Mai 1999 (27.05.99) DE		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Gässelweg 15, D-69469 Weinheim (DE).		
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): STÄHLER, Cord, F. [DE/DE]; Siegfriedstrasse 9, D-69469 Weinheim (DE). STÄHLER, Peer, F. [DE/DE]; Riedfeldstrasse 3, D-68169 Mannheim (DE). MÜLLER, Manfred [DE/DE]; Reuterstrasse 76/b, D-80689 München (DE). STÄHLER, Fritz [DE/DE]; Gässelweg 15, D-69469 Weinheim (DE). LINDNER, Hans [DE/DE]; Vierreichweg 27, D-70569 Stuttgart (DE).		

(54) Title: SUPPORT FOR A METHOD FOR DETERMINING AN ANALYTE AND A METHOD FOR PRODUCING THE SUPPORT

(54) Bezeichnung: TRÄGER FÜR ANALYTBESTIMMUNGSVERFAHREN UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG DES TRÄGERS

(57) Abstract

The invention relates to a support for a method for determining an analyte comprising a multitude of channels, especially capillary channels. A multitude of different receptors is immobilized in the channels by, in particular, by exposure to light. The invention also relates to a method for producing such a support.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein Träger für Analytbestimmungsverfahren angegeben, umfassend eine Vielzahl von Kanälen, insbesondere Kapillarkanälen, wobei in den Kanälen eine Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptoren insbesondere durch Belichtung immobilisiert ist. Ferner wird ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Trägers beschrieben.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Amenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

- 1 -

Träger für Analytbestimmungsverfahren und Verfahren zur Herstellung des Trägers

Beschreibung

5

1 Anwendungsgebiet der Erfindung

1.1 Hintergrund

- 10 Für die Grundlagenforschung in den Biowissenschaften und für die medizinische Diagnostik sowie einige andere Disziplinen ist die präzise Detektion biologisch relevanter Moleküle in definiertem Untersuchungsmaterial von herausragender Bedeutung. Dabei liegt die genetische Information in Form einer enormen Vielfalt von unterschiedlichen Nukleinsäuresequenzen vor, der DNA. Die Realisation dieser Information führt über die Herstellung von Abschriften der DNA in RNA meist zur Synthese von Proteinen, die ihrerseits häufig an biochemischen Reaktionen beteiligt sind.
- 20 Die Detektion von bestimmten Nukleinsäuren und die Bestimmung der Abfolge der vier Basen in der Kette der Nukleotide, die generell als Sequenzierung bezeichnet wird, liefert wertvolle Daten für Forschung und angewandte Medizin. In der Medizin konnte in stark zunehmendem Masse durch die in vitro-Diagnostik (IVD) ein Instrumentarium zur Bestimmung wichtiger Patientenparameter entwickelt und dem behandelnden Arzt zur Verfügung gestellt werden. Für viele Erkrankungen wäre eine Diagnose zu einem ausreichend frühen Zeitpunkt ohne dieses Instrumentarium nicht möglich. Hier hat sich die genetische Analyse als wichtiges neues Verfahren etabliert, z.B. für Infektionskrankheiten wie HIV und HBV, genetische Prädisposition für bestimmte Krebsarten oder andere Erkrankungen, Forensik und eine Vielzahl weiterer Anwendungsgebiete. In enger Verzahnung von Grundlagenforschung und klinischer Forschung konnten die molekularen
- 25
- 30

- 2 -

Ursachen und (pathologischen) Zusammenhänge einiger Krankheitsbilder bis auf die Ebene der genetischen Information zurückverfolgt und aufgeklärt werden. Diese Entwicklung steht allerdings noch am Anfang, und gerade für die Umsetzung in Therapiestrategien bedarf es stark intensivierter

5 Anstrengungen. Insgesamt haben die Genomwissenschaften und die damit verbundene Nukleinsäureanalytik sowohl zum Verständnis der molekularen Grundlagen des Lebens als auch zur Aufklärung sehr komplexer Krankheitsbilder und pathologischer Vorgänge enorme Beiträge geleistet.

10 Die weitere Entwicklung in der medizinischen Versorgung wird durch die Explosion der Kosten belastet, die mit entsprechend aufwendigen Verfahren verbunden sind. Hier muß nicht nur auf die Realisation der Möglichkeiten an diagnostischem und therapeutischem Nutzen gedrängt, sondern auch eine Integration in ein tragfähiges, finanzierbares Gesundheitssystem
15 vorangetrieben werden.



Eine Anwendung entsprechender Technologien in der Forschung kann ebenfalls nur dann in breitem Umfang und auch im akademischen Bereich erfolgen, wenn die damit verbundenen Kosten reduziert werden.

20

1.2 Bedarf



Die Entwicklung der Genom- und Proteomwissenschaften und die Entschlüsselung des Erbgutes stehen noch am Anfang der Entwicklung,
25 ebenso die Realisation des diagnostischen Potentials einer genetischen bzw. gentechnischen Analyse. Die bisher etablierten Verfahren sind meist arbeitsaufwendig und relativ ineffizient, was sich in Kosten und Kapazität z.B. an Informationsgewinn niederschlägt. Wichtigste Neuerung ist die Entwicklung von sog. Oligonukleotid-Arrays, bei denen eine sehr große
30 Anzahl von relativ kurzen Oligonukleotiden definierter Sequenz auf einer festen Matrix (meist Silizium) angekoppelt sind und dadurch für eine parallele Hybridisierung komplementärer Sequenzen im Untersuchungsgut

- 3 -

zur Verfügung stehen. Die aufwendige Herstellung und der hohe Preis lassen die Vermarktung als Massenprodukt zum gegenwärtigen Zeitpunkt aber nicht zu.

5 1.3 Anwendungsfelder

Für die in vitro Diagnostik und klinische Diagnostik soll durch deutlich preiswertere Systeme die Anwendung in der Routine möglich werden, z.B. für Infektionskrankheiten (HIV, HBV etc.) und deren Subtypen, für die
10 Onkologie (Tumorfrüherkennung, Tumorklassifizierung, z.B. Typ und Status), und für die Bestimmung einer genetischen Prädisposition.

Für die biologische Grundlagenforschung, insbesondere die Genomik, ist die Erfassung von sehr vielen Meßpunkten im untersuchten System, z.B. alle
15 exprimierten Gene wünschenswert. Daraus ergibt sich ein enormer Erkenntnisgewinn in der biologischen Grundlagenforschung (Entwicklungsbiologie, Stammzellkultur, Tissue-engineering, Transplantationsmedizin, Regeneration) ableiten, der auch zu wichtigen Durchbrüchen in der Biomedizin und zu entsprechenden Anwendungen führen wird.

20 Wie für die Verwendung von DNA-Chips gezeigt wurde (Science 280:1077-1082), kann durch entsprechende biochemische Rahmenbedingungen in der Hybridisierung zwischen Punktmutationen in der Basenabfolge unterschieden werden. Mit dem hier beschriebenen System
25 ist damit ein breit angelegtes Screening möglich, das für forensische Zwecke, z.B. zur Überführung von Straftätern oder zum Verwandtschaftsnachweis eingesetzt werden kann.

Durch diese Erfindung wird auch das rasche, kosteneffektive Analysieren
30 von Lebensmitteln z.B. auf das Vorhandensein bestimmter Gene von pathogenen Keimen oder von genetisch veränderten Organismen hin möglich.

- 4 -

Ebenfalls von großer Bedeutung ist das Screening von medizinischen Produkten. Die Herstellung z.B. von Blutpräparaten ist immer noch mit einem hohen Aufwand für die Sicherheitsvorkehrungen zur Reinheit verbunden. Ein zeit- und kosteneffektives Screening solcher Proben wird mit dieser Erfindung möglich werden, um z.B. eine Kontamination mit infektiösem Material zu verhindern (HIV, HBV, HCV etc).

2. Stand der Technik

Bei BioChips handelt es sich um miniaturisierte hybride Funktionselemente mit biologischen und technischen Komponenten, z.B. an der Oberfläche eines Trägers immobilisierte Biomaterialien, die als spezifische Interaktionspartner dienen können (z.B. DNA-Oligonukleotide) und eine SiliziumMatrix. Meist sind diese Funktionselemente in Reihen und Spalten angeordnet, man spricht dann von BioChip-Arrays. Da Tausende von biochemischen Funktionselementen auf dem BioChip angeordnet sein können, müssen diese mit mikrotechnischen Methoden hergestellt werden.

Vor allem in den USA wird die Entwicklung von miniaturisierten BioChips mit enormen Mitteln vorangetrieben. Die wichtigsten in diesem Umfeld tätigen Firmen sind im folgenden aufgelistet:

Affymetrix, Beckman Instruments, Blue Chip Biosystems, Caliper Technologies, Cura-Gen, Genometrix, Gene Trace Systems, Hyseq, Incyte Pharmaceuticals, Molecular Tool, Nanogen, Pharmacia, Synteni, Third Wave Technologies, Vysis.

Bisher bekannte BioChips lassen sich nach folgenden Kriterien klassifizieren:

- * Nachweisprinzip:
 - Chromatographische Verfahren

- 5 -

- Interaktion von Analyten mit fester Phase, meist immobilisierter Interaktionspartner (z.B. Hybridisierung von Nukleinsäuren an DNA-Oligonukleotide).
- * Detektionsverfahren (optisch, elektrisch).
- 5 * Markerbasierte Nachweisverfahren (z.B. Absorption, Fluoreszenz oder Lumineszenz) oder markerfreie Nachweisverfahren (Lichterzeugung zum Reaktionsnachweis).
- * Zuordnung des Analyten zu seinem Träger [Festphase] (Array mit mehr als einem immobilisierten Interaktionspartner pro 10 Träger oder Single mit nur einem immobilisierten Interaktionspartner pro Träger).
- * Herstellungsverfahren (z.B. Oligonukleotide direkt auf dem BioChip lichtaktiviert synthetisieren, fertig synthetisierte Oligonukleotide spotten, Beads oder Tubes beschichten).
- 15 * Trägerarten (Glas-Chips, Kunststoff-Chips, Mikrotiterplatten, Tubes oder Beads).
- * Präsentation zur Detektion (seriell, parallel).
- * Optische Detektion (seriell im Scanner oder parallel mit einer CCD-Kamera).

20 Unter den aufgeführten Firmen verwendet lediglich Affymetrix das Prinzip der Photolithographie für eine "high density" Erzeugung von DNA-Arrays auf einer planaren Oberfläche, wodurch sie die Parallelisierung der Detektion von Oligo-Sequenzen mit Abstand weitesten voran getrieben haben.

25 GenChip von Affymetrix Inc., Santa Clara, Kalifornien:

Die Herstellung erfolgt durch *in situ* Synthese von DNA-Oligonukleotiden auf planaren Chips in hoher Dichte (Juli 98: bis 64.000 unterschiedliche Oligos 30 auf 1 cm²). Das Herstellungsverfahren basiert auf der in der Halbleiter-Industrie verwendeten und optimierten Photolithographie, wobei eine lichtaktivierbare Bindung von Oligos an die Chipoberfläche, sowie an

- 6 -

bereits vorhandene Oligos, verwendet wird. Die Herstellungsduer beträgt aufgrund einer Vielzahl von Verfahrensschritten mehrere Stunden. Der Nachweis erfolgt durch serielle optische Detektion des planaren Chips in einem Fluoreszenzscanner. Die Hybridisierungsdauer der Probe auf einem Chip beträgt ca. 1.5 Stunden. Erste Produkte (Sequenzierchip für Tumormarker p53 Exons 2-11, Brustkrebsgen BRCA1 Exon 11, HIV GeneChip) sind bereits kommerziell erhältlich. Die Kosten liegen zur Zeit im Bereich mehrerer hundert Dollar für einen GenChip, zusätzlich wird noch eine Detektionseinheit benötigt.

10

Weiterer relevanter Stand der Technik sind WO91/18276, EP-A-0 671 626 und EP-A-0 430 248.



3. Gegenstand der Erfindung und damit gelöste Aufgabe

15

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Trägers für die Bestimmung von Analyten umfassend die Schritte

- (a) Bereitstellen eines Trägerkörpers umfassend mindestens einen Kanal,
- (b) Leiten von Flüssigkeit mit Bausteinen für die Synthese polymerer Rezeptoren durch den Kanal oder die Kanäle des Trägerkörpers,
- 20 (c) orts- oder/und zeitspezifisches Immobilisieren der Rezeptorbausteine an jeweils vorbestimmten Positionen bzw. Bereichen in dem Kanal oder in den Kanälen und
- (d) Wiederholen der Schritte (b) und (c) bis die gewünschten Rezeptoren an den jeweils vorbestimmten Positionen bzw. Bereichen synthetisiert 25 worden sind.



Bevorzugte Ausgestaltungen dieses Verfahrens sind Gegenstand der Ansprüche 2 bis 13. Der Träger ist ein mit biologischen oder chemisch funktionellen Materialien bzw. Rezeptoren (Sonden) oder Bausteinen davon bestückbare oder bestückte Festphase. In dieser Ausführungsform der Erfindung weist der Träger eine mit Vertiefungen, z.B. mindestens einem

30

- 7 -

Kanal und besonders bevorzugt mit einer Vielzahl von Kanälen versehene Oberfläche auf. Die Kanäle sind vorzugsweise Mikrokanäle mit einem Querschnitt von z.B. 10 bis 1000 µm. Die Kanäle können - abhängig von den Oberflächeneigenschaften - Kapillarkanäle, aber auch Kanäle ohne 5 Kapillarwirkung (z.B. aufgrund von Beschichtung mit Teflon) sein. Der Träger ist bevorzugt zumindest teilweise im Bereich der mit Rezeptoren zu bestückenden Positionen bzw. Bereiche optisch transparent. Die mit Rezeptoren zu bestückenden Bereiche des Trägers sind vorzugsweise chemisch und physikalisch miteinander identisch, d.h. sie weisen eine im 10 wesentlichen gleiche Oberflächenbeschaffenheit auf.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren nach Anspruch 14 zur integrierten Synthese und Analytbestimmung an einem Träger umfassend die Schritte

- 15 (a) Bereitstellen eines Trägerkörpers,
 - (b) Leiten einer Flüssigkeit mit darin enthaltenen Rezeptoren oder Bausteinen für die Synthese von polymeren Rezeptoren über den Träger,
 - (c) orts- oder/und zeitspezifisches Immobilisieren der Rezeptoren oder 20 Rezeptorbausteine an jeweils vorbestimmten Positionen bzw. Bereichen auf dem Träger,
 - (d) gegebenenfalls Wiederholen der Schritte (b) und (c) bis die gewünschten Rezeptoren an den jeweils vorbestimmten Positionen bzw. Bereichen auf dem Träger synthetisiert worden sind,
 - 25 (e) Inkontaktbringen des Trägers mit einer die zu bestimmenden Analyten enthaltenden Probe und
 - (f) Bestimmen der Analyten über deren Bindung an die auf dem Träger immobilisierten Rezeptoren.
- 30 Bevorzugte Ausgestaltungen dieses Verfahrens sind Gegenstand der Ansprüche 15 bis 25. In dieser Ausführungsform können auch planare Träger verwendet werden.

- 8 -

Gegenstand von Anspruch 26 ist ein Träger für die Bestimmung von Analyten umfassend mindestens einen Kanal und vorzugsweise eine Vielzahl von Kanälen insbesondere Kapillarkanälen, wobei in den Kanälen eine Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptoren immobilisiert ist. Vorzugsweise ist der Träger zumindest im Bereich der mit Rezeptoren zu bestückenden Bereiche optisch transparent.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Reagenzienkit nach Anspruch 28 umfassend einen Träger wie zuvor beschrieben und Bausteine für die Synthese von polymeren Rezeptoren auf dem Träger. Weiterhin kann der Reagenzienkit noch Reaktionsflüssigkeiten zur Synthese der Rezeptoren auf dem Träger enthalten.



Gegenstand der Erfindung ist auch eine Vorrichtung zur integrierten Synthese und Analytbestimmung an einem Träger nach Anspruch 29 umfassend eine programmierbare Lichtquellenmatrix, eine Detektormatrix, einen zwischen Lichtquellen -und Detektormatrix angeordneten Träger sowie Mittel zur Zufuhr von Fluids in den Träger und zur Ableitung von Fluids aus dem Träger. Die programmierbare Lichtquellen- bzw. Belichtungsmatrix kann eine Reflexionsmatrix, eine Lichtventilmatrix, z.B. eine LCD-Matrix oder eine selbstemittierende Belichtungsmatrix sein. Bevorzugte Ausgestaltungen dieser Vorrichtungen ist Gegenstand der Ansprüche 30 und 31.



Schließlich noch ein Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung des beanspruchten Verfahrens, Trägers, Reagenzienkits sowie der beanspruchten Vorrichtung zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe. Bevorzugte Anwendungen sind Gegenstand der Ansprüche 33 bis 38.

Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt ein Verfahren und System zur zyklischen integrierten Synthese und Analyse dar, welches als ISA-System bezeichnet sein soll. Durch diese erfindungsgemäß bevorzugte unmittelbare Kopplung von Synthese und Analyse wird in einem zyklisch

- 9 -

verlaufenden Verfahren eine gegenüber dem Stand der Technik deutlich verbesserte Hochdurchsatz-Bestimmung von Analyten ermöglicht. Dabei können die zu analysierenden Substanzen beispielsweise als Bruchstücke oder Fragmente einer größeren Molekülkette vorliegen.

5

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine direkte logische Verknüpfung zwischen den Ergebnissen der Analyse eines ersten Trägers und der Synthese des darauffolgend zu erstellenden Trägers bereitgestellt, wobei sich der Informationsgewinn aus einem vorhergehenden Zyklus in einen nachfolgenden Zyklus übertragen lässt. Auf diese Weise wird ein Lernen des Analysesystems schrittweise entwickelt.

10

Die besagte zyklisch verlaufende Abfolge von Synthese, Sequenzvergleich, Analyse der Vergleichsergebnisse und wiederum erfolgender Synthese von Rezeptoren am Träger kann beliebig oft - bis zum Erreichen eines gewünschten, beliebig zu wählenden Abbruchkriteriums - wiederholt werden.

15

Durch die Rückkopplung und den damit verbundenen Lernprozeß von vorhergehendem Zyklus sind das erfindungsgemäße Verfahren und die Vorrichtung auch für die Erforschung sehr großer und komplexer Analyt-Molekülketten, z.B. zum Sequenzieren individueller Genome, wie dem menschlichen Genom, geeignet. Der Zeitaufwand verbessert sich dabei gegenüber dem Stand der Technik mindestens um das hundertfache, eher um das tausendfache und potentiell um das 10.000-fache.

20

Das Verfahren kann zur "Neusequenzierung" nicht bekannter Nukleinsäuresequenzen (DNA, cDNA, RNA) einschließlich deren räumlichen Zuordnung, respektive Kartierung eingesetzt werden. Mit diesem Vorgehen ist es möglich, ein individuelles Genprofil jedes Individuums und jeder Spezies zu erstellen, sei es durch Sequenzierung von Teilen des Genoms oder des ganzen Genoms.

25

- 10 -

Weiterhin kann das Verfahren zur "Resequenzierung" von Nukleinsäuresequenzen eingesetzt werden, d.h. zum Vergleich von bereits bekannten Sequenzen (repräsentiert in Form der Rezeptorsonden) mit unbekannten Sequenzen in der zu untersuchenden Probe. Die bekannten 5 Sequenzen werden dazu gezielt und der Fragestellung entsprechend ausgewählt.

Die beschriebene Resequenzierung erlaubt es dem Anwender, individuelle polymere Rezeptoren vor Ort auf dem erfindungsgemäßen Träger ausgehend 10 von einem neutralen Träger zu erzeugen und anschließend sofort eine Analyse der zu untersuchenden Probe durchzuführen. Durch diese Möglichkeit entsteht eine maximale Variantenvielfalt der Rezeptoren bei minimalem Platzbedarf.

15 Durch Kombination von Neu- und Resequenzierung, können diagnostische Tests oder Medikamente kurzfristig an die Bedürfnisse eines Individuums angepaßt werden.

Als weiteres wichtiges Anwendungsgebiet können außerordentlich flexibel 20 Expressionsmuster analysiert werden. Die entsprechenden Rezeptoren bzw. Polymersonden werden dazu in aller Regel anhand bekannter Sequenzen ausgewählt. Der Einsatz des Verfahrens zur Bestimmung der Genexpression kann auch im Kontext von Hochdurchsatz-Screening erfolgen.

25 Darüber hinaus sind mit unterschiedlichen natürlich vorkommenden und künstlichen Rezeptorsonden unterschiedliche Ansätze für Screening-Verfahren und den Aufbau und die Analyse von Substanzbibliotheken denkbar. Dies kann z.B. im Zusammenhang mit der Suche nach und der Charakterisierung von pharmakologisch aktiven Substanzen erfolgen.

30

Die Anwendungsfelder für das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäße Vorrichtung zur zyklisch integrierten Synthese und

- 11 -

Bestimmung von Analyten sind breitgefächert und erstrecken sich prinzipiell auf alle Anwendungen der Analyse wie Gas-Chromatographie, Dünnschicht-Chromatographie, Gel-Elektrophorese, Kapillar-Elektrophorese, Massenspektrometrie etc. Gleches gilt prinzipiell für alle Anwendungen
5 hochparalleler Festphasen-Analyse.

Die Notwendigkeit, fertige und komplexe polymere Rezeptoren zu lagern, entfällt vollständig. Darüber hinaus gibt es keine physikalische Beschränkung bezüglich der Anzahl und Auswahl der Rezeptoren. Die
10 benötigte Anzahl der Rezeptoren kann über mehrere Reaktionsträger bzw. mehrere Zyklen in einem Reaktionsträger verteilt werden, da die einzelnen Rezeptoren für die logische Auswertung der Vergleichsergebnisse keinen Ortsvorgaben unterliegen.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein neuer "Träger" als Basis für die Verwendung einer vorzugsweise lichtgesteuerten Synthese einzelner Basen (G, A, C und T) oder ganzer Oligonukleotide (Basen-Sequenzen) zur Bildung einer hochparallelen, -planaren und -dichten Anordnung (Array) dieser Oligonukleotide in einer festen Trägermatrix (Chip).

20 Der neue BioChip, der "opto-fluidische Mikroprozessor", enthält eine Struktur aus Mikrokanälen, vorzugsweise Kapillaren in einem zumindest teilweise durchsichtigen und vorzugsweise flachen Körper. Die flüssigen Einsatzstoffe werden bei der Rezeptorsynthese oder -immobilisierung durch
25 die Kanäle im Träger geführt und binden, lokal aktiviert, an den Kanalwänden. Damit werden die technischen Voraussetzungen für eine schnelle, effiziente und damit kostengünstige Herstellung geschaffen, was den breiten Einsatz dieser Träger ermöglichen wird. Dichte und Parallelität liegen in der gleichen Größenordnung wie bei Konkurrenztechniken, mit
30 mehreren hunderttausend definierten Oligonukleotiden auf einem Träger. Der Vorteil der neuen Technik liegt in den günstigeren physiko-chemischen

- 12 -

Eigenschaften der Strömungs- und Benetzungs vorgänge in den Kanälen im Vergleich mit einer einheitlichen Oberfläche.

Die Chip-Produktion besteht aus der Erzeugung eines vorzugsweise mit Mikrokanälen versehenen Trägerkörpers aus einem geeigneten, lichtdurchlässigen Material sowie dem biochemischen Beschichtungsvorgang vorzugsweise an den Wänden der einzelnen Mikrokanäle, so daß anschließend die polymeren Rezeptoren, z.B. Oligonukleotide, in den Kanälen synthetisiert werden können. Hierbei werden in den einzelnen Kanälen im Träger, mittels Photoaktivierung durch eine geeignete Lichtquelle einzelne Rezeptorbausteine, oligomere Synthone (z.B. Di-, Tri-, Tetra- oder Pentanukleotide) oder ganze Basen-Sequenzen (Oligos) ortsspezifisch angelagert. Dadurch entstehen in jedem Kanal eine Vielzahl an Rezeptor-bestückten Bereichen (spezifische Bindungs- bzw. Hybridisierungsstellen), wobei jeder Bereich aufgrund seiner individuellen Rezeptor-Sequenz-Kombination für die Bindung und anschließende Detektion eines spezifischen Analyten, z.B. eines DNA-Fragments dient. Die Bereiche sind in einer Dimension des planaren Trägers durch die Wände der Kanäle voneinander getrennt und entlang der einzelnen Kanäle wird zwischen zwei benachbarten Bereichen bei der photoaktivierten Bindung ein entsprechender Freiraum gelassen. Es entsteht ein hoch paralleler, hoch integrierter Array von spezifischen Rezeptoren. Aufgrund der Möglichkeit des Multiplexens von Oligo-Sequenzen und parallelen Kanälen (Details siehe Kapitel 5) ist eine Reduktion der Herstellzeiten auf 1/4 bei der Verwendung einfacher Basen, 1/8 bei Dinukleotiden und auf 1/16 bei Trinukleotiden durch entsprechendes Multiplexing der Oligos (Einsatzstoffe) und der zu benetzenden Kanälen möglich. Damit wird auch eine flexible Anpassung an Kundenwünsche, der "massgeschneiderte" BioChip, möglich. Diese systematische Beschleunigung ist in planaren Systemen (planaren Chips) nicht möglich.

30

Für die Analyse wird das Untersuchungsmaterial (z.B. DNA, RNA in Lösung) durch die Kanäle geführt und erhält Gelegenheit zur Bindung an die

Rezeptoren, z.B. durch Hybridisierung an komplementäre Stränge, sofern diese vorhanden sind. Zur Detektion und Auswertung der jeweiligen Analytbindung, z.B. einer DNA-Hybridisierung, werden vorzugsweise hochauflösende, parallele CCD-Chips verwendet. Die Bindung des Analyten an den immobilisierten Rezeptor wird durch geeignete aus dem Stand der Technik bekannte signalgebende Gruppen, z.B. Licht-emittierende Gruppen. Es sind aber auch neue Detektionsverfahren anwendbar. Bei der Detektion kann auf optisch abbildende Linsensysteme verzichtet werden, wenn die Größe der Kanäle so gewählt wird, daß jeder Meßpunkt eine ausreichende Anzahl Pixelelemente des Detektors, z.B. eines CCD-Chips überdeckt. Durch diese direkte Nutzung (keine Optik) hoch paralleler CCD-Matrix Chips mit einer großen Anzahl (derzeit 16 Mio. Pixel pro 1 cm²; Stand der Forschung: 80 Mio. Pixel pro 1 cm²) an Pixeln (optischen Sensoren) ist es möglich eine Vielzahl von Lichtsignalen parallel zu detektieren (siehe BioScanner der Firma Genometrix). Damit wird versucht, auch bei der Detektionseinheit statt teurer optischer Anordnungen auf ein in großer Stückzahl und zu niedrigen Preis gefertigtes High-Tech Produkt zurückzugreifen.

Durch die Erfindung werden somit wesentliche Anforderungen in der DNA-Analytik abgedeckt, nämlich simultane Bestimmung einer Vielzahl an DNA-Sequenzen (erreicht durch hoch integrierte, miniaturisierte Träger und eine hochauflösende optische Detektion), Bereitstellung kostengünstiger Tests (Multiplexing in der Produktion, billige "Disposable"-Träger zum Beispiel aus Spritzguß, schnelle Synthese bei der Produktion), eine schnelle Durchführung bei der Analyse aufgrund kleinerer Volumina und günstiger Benetzungsorgänge, Reduktion der Einsatzstoffe durch die Strömungsgeometrie des Träger etc.), schnelle Auswertung (erreicht durch die parallele optische Auswertung in planarer Anordnung [DNA-Chip Array]), ein kostengünstiges Analysesystem (erreicht durch den Verzicht auf teure, mikrosystemtechnische und optische Komponenten) und die Sicherstellung der Qualität sowohl bei der Produktion, als auch bei der Analyse (erreicht durch definierte Strömungsorgänge im Träger).

- 14 -

Die Verwendung der Photoaktivierung von chemischen Reaktionen im Bereich der Träger-Synthese kommt insbesondere in Kombination mit der Technologieplattform des opto-fluidischen Mikroprozessors zusammen mit einer programmierbaren Lichtquellenmatrix zum Durchbruch, da hierdurch
5 die Produktionskosten für einen einzelnen Träger, bei gleichzeitiger Qualitätsverbesserung, um den Faktor 10-100 reduziert werden können. Dadurch wird zum ersten mal eine kostengünstige, massiv parallele, hoch integrierte und gleichzeitig einfach miniaturisier- und automatisierbare DNA-Chip-Technologie zur Verfügung gestellt.

10

Trotz der komplexen Datenauswertung bedarf es nur eines Minimums an unterschiedlichen Hardware-Komponenten, da die Trägerkörper, die entweder pro Zyklus oder auch nur bei Verschleiß gewechselt werden müssen, zunächst - vor Beginn der Rezeptorsynthese - alle identisch sind.
15 Alle Individualität ergibt sich erst aus der spezifischen Rezeptorsynthese und aus der schrittweise durch die Analyse gewonnene Information, die nach dem Synthese/Analysezyklus wieder in Information überführt wird, so daß die Individualität, d.h. die kennzeichnenden Merkmale der biologischen/chemischen Materie wiederum nur in Form elektronischer
20 Daten vorliegen.

4. Grundzüge des Lösungsweges

Der prinzipielle Lösungsweg in diesem System basiert auf der schrittweisen
25 biochemischen Synthese von Rezeptoren an die Oberflächen einer Vielzahl von Kanalwänden auf einen Träger. Diese Kanäle sind auf dem Träger, z.B. einem kleinen planaren Chip, angeordnet. Die Synthese erfolgt mit den entsprechenden Basen oder mehrbasigen Oligonukleotiden (Basen-Sequenzen) über eine lichtaktivierte ortsspezifische Bindung. Die Benetzung
30 dieser spezifisch "gelabelten" Kanäle mit den zu untersuchenden DNA-Analyten und der anschließenden Detektion der Bindungsreaktion über geeignete signalgebende Gruppen schließt einen Verfahrenszyklus ab.

- 15 -

4.1 Mikrostruktur als Trägermatrix

Die Träger-Synthese umfaßt die Bereitstellung des Trägerkörpers, der vorzugsweise aus einem geeigneten, lichtdurchlässigen Material besteht,
5 sowie dem biochemischen Erzeugen von Rezeptoren an den Wänden der einzelnen Kanäle. Die spezifische Synthese der Rezeptoren kann entweder direkt bei der Herstellung des Trägerkörpers oder erst beim Anwender erfolgen.

10 Für die Trägerkörper können unterschiedliche Materialien (z.B. Glas, Silizium, Keramik, Metall oder Kunststoff) verwendet werden. Wichtig ist, daß die Wände der Kanäle sowohl für die Anregungswellen bei der lichtaktivierten Synthese sowie die Lichtwellen (ggf. Anregung und Reaktionssignal) bei der anschließenden Detektion (Analyse) gut durchlässig sind.
15 Je nachdem welches Material eingesetzt wird, müssen die Wände der Kanäle mit einem reaktionsfähigen Material beschichtet werden, damit die Rezeptoren oder Rezeptorbausteine an der Oberfläche binden können.

20 Die Geometrie der Träger entspricht beispielsweise einer "Scheckkarte", wobei die Größe der von den Kanäle bedeckten Fläche von dem zur Detektion verwendeten CCD-Chip bestimmt wird. Für die Kanäle im Träger sind unterschiedliche Herstellverfahren einsetzbar. Hierbei ist der Einfluß der Querschnittsgeometrie der Kanäle zu berücksichtigen, welcher großen Einfluß auf die entstehenden strömungstechnischen Kräfte und die
25 Möglichkeit der Reinigung der Kanäle hat. Als Herstellverfahren kann man zum Beispiel Laser, Fräsen, Ätztechniken oder Spritzguß verwenden.

Bei der Anordnung der Kanäle in der Ebene sind die folgenden Aspekte zu berücksichtigen: Verwendet man eine Vielzahl an parallelen Kanälen, so
30 kann man die Zeiten bei der Synthese minimieren, allerdings ist die Benutzung bzw. Befüllung des einzelnen Kanals entsprechend komplex. Hat man im anderen Extrem nur einen einzigen langen Kanal, so ist die Synthese

- 16 -

entsprechend langsam, da das Multiplexing von Kanälen zu Basen oder ganzen Oligos nicht verwendet werden kann und alle Vorgänge nur seriell nacheinander ablaufen können. Der Vorteil nur eines Kanals liegt in der Analyse, wo die Probe an jedem Meßpunkt in allen Kanälen vorbeiströmt.

5

4.2 Synthesezyklus im Träger

- In einem Trägerkörper werden die zur Beschichtung mit Rezeptoren vorgesehenen Positionen (Reaktionsbereiche) durch Kanäle aus Behältern über Zuleitungen, Ventile und Fittings mit einem oder mehreren Fluiden gefüllt. Mit Hilfe einer aus der deutschen Patentanmeldung 198 39 254.0 bekannten Lichtemissions/Detektionseinrichtung, die vorzugweise eine programmierbare Lichtquellen- bzw. Belichtungsmatrix darstellt, wie sie in der deutschen Patentanmeldung 199 07 080.6 beschrieben ist, können 10 ausgewählte Positionen bzw. Bereiche des Trägers belichtet und auf diese Weise die individuelle Synthese von Rezeptoren gesteuert werden, wobei der Träger in diesem Zusammenhang einen opto-fluidischen Mikroprozessor darstellt. Anstelle einer Belichtung ist auch eine individuelle fluidische Aktivierung der ausgewählten Reaktionsbereiche möglich. Nach Abschluß 15 der Reaktion werden die Reaktionsbereiche gespült und neu gefüllt, wonach sich wiederum ein Aktivierungszyklus anschließt. Der Verlauf der Rezeptorsynthese kann mittels geeigneter Detektionseinrichtungen verfolgt und gesteuert werden.
- 20 Sobald die Synthese der Rezeptoren abgeschlossen ist, werden die Reaktionsbereiche gereinigt und stehen dann für ein Analytbestimmungsverfahren zur Verfügung.

4.3 Nukleinsäureanalytik mittels Oligo-chips - Grundprinzip

Wie bereits für mehrere Anordnungen gezeigt (z.B. Molecular Medicin Today, 9/97, S. 384-389; Trends in Biotechnology, 11/97, S. 465-468)

5 kann die Hybridisierung von Nukleinsäuresträngen an eine meist kurze komplementäre Sequenz, ein sog. Oligonukleotid oder Oligo, für die Sequenz-Analyse verwendet werden. Dazu werden hochdichte Anordnungen synthetischer Oligonukleotide auf einer festen Matrix erzeugt und erlauben multiple parallele Hybridisierungsexperimente. Führendes
10 Verfahren (August 98) ist eine photolithographische und damit lokale Aktivierung von Synthese-Vorstufen. In Anlehnung an die aus der Mikroelektronikherstellung entlehnte Technik werden die parallelen Anordnungen als Chips bezeichnet.

15 Durch eine massive Erhöhung der Zahl an Reaktionsbereichen ('Meßpunkten'), d.h. definierten Oligos an definiertem Ort, wird eine enorme analytische Kapazität geschaffen.

Die zu untersuchende Probe enthält normalerweise DNA oder RNA. Diese
20 muß eventuell isoliert und in einem Amplifizierungsschritt (z.B. PCR) vermehrt werden und erhält dabei eine Markierung, z.B. ein Farbstoff-, Fluoreszenz- oder Lumineszenzlabel.

Durch ausreichend viele Rezeptor-bestückte Bereiche (Reaktionsbereiche)
25 ist auch eine Sequenzierung eines DNA Moleküls möglich (Sequencing-by-Hybridization SBH, siehe BioTec 3/98, S. 52-58), andere Anwendungen zeigen die Bestimmung von Punktmutations-Polymorphismen (d.h. Unterschiede zwischen Individuen in einzelnen Basen in einem definierten DNA Abschnitt) und erlauben u.a. eine Identifizierung von
30 solchen Polymorphismen bei hunderten von Probanden parallel (Science 280, 5/98, S. 1077-1082).

- 18 -

Erstmals wird auch die Untersuchung von ganzen Genomen und des Gen-Expressions-Status ganzer Zellen möglich (z.B. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 95, 3/98, S. 3752-3757).

5 Die hier beschriebene Erfindung läßt demnach die Anwendung einer Vielzahl von etablierten Verfahren zur Untersuchung von Nukleinsäuren und genetischem Material zu. Damit ist gleichzeitig ein starker Anstieg solcher Anwendungen und damit ein enormer wissenschaftlicher Fortschritt verbunden, da erwartet wird, daß der opto-fluidische Mikroprozessor eine
10 solche Technologie flexibler als die vorhandenen Verfahren und zu deutlich niedrigeren Kosten bereitstellt.

4.4 Lichtaktivierte Synthese von Oligonukleotiden und Peptiden auf dem Träger

15 Beim Aufbau von Rezeptoren auf dem Träger werden in den einzelnen Bereichen mittels Photoaktivierung durch eine geeignete Lichtquelle Rezeptorbausteine, z.B. einzelne Basen (G, A, C, T) oder Oligonukleotid-Sequenzen (vorzugsweise etwa 2 bis 4 Basen lang) ortsspezifisch
20 angelagert. Die Kanäle werden sequentiell mit den Synthesebausteinen, z.B. G, A, C und T, gefüllt und entlang der Kanäle ortsspezifisch mit hochauflösendem Licht bestimmter Wellenlänge und Intensität bestrahlt. Zwischen den Beschichtungszyklen werden die Kanäle entsprechend gespült, um nicht gebundene Rezeptorbausteine zu beseitigen.

25 Hierdurch entstehen in jedem Kanal eine Vielzahl an Reaktionsbereichen (spezifische Bindungs- bzw. Hybridisierungsstellen), wobei jeder Reaktionsbereich aufgrund seiner individuellen Rezeptor-Sequenz für die Bindung und anschließende Detektion eines spezifischen Analyten, z.B. eines DNA-Fragments dient. Die Reaktionsbereiche sind in der einen Dimension des planaren Trägers durch die Wände der Kanäle voneinander
30 getrennt und in der zweiten Dimension, entlang der einzelnen Kanäle, wird

- 19 -

zwischen zwei benachbarten Reaktionsbereichen bei der Photoaktivierung ein entsprechender Freiraum gelassen.

Die Photolithographie kann auch weiterhin für die lichtaktivierte Bindung der
5 Rezeptorbausteine verwendet werden. Es können aber auch andere
Verfahren eingesetzt werden.

Besonders bevorzugt wird ein Belichtungsverfahren unter Verwendung einer
programmierbaren Lichtquellenmatrix, z.B. einer selbstleuchtenden
10 Lichtquellenmatrix, einer Lichtventilmatrix oder einer Reflexionsmatrix
durchgeführt, deren Matrixpunkte bzw. Lichtquellenelemente gezielt
steuerbar sind, insbesondere hinsichtlich der Intensität und gegebenenfalls
Farbe des Lichtes. Mit einer solchen Matrix können also jeweils benötigte
15 zweidimensionale Belichtungsmuster auf einfache Weise, insbesondere
rechnergestützt erzeugt werden. Die bevorzugte Photoaktivierung der Oligos
bei der Herstellung des Trägers erfolgt direkt durch die Belichtungsmatrix.
Die hierfür benötigte Wellenlänge von beispielsweise 365 nm (oberer UV-
Bereich nahe dem sichtbaren Licht) lässt sich mit allen Varianten der
programmierbaren Lichtquellenmatrix steuern.

20 Auf entsprechende Weise können auch Rezeptoren aus Aminosäure-
oder/und Peptidbausteinen aufgebaut werden.

4.5 CCD-Chip-Detektion der spezifischen Nachweisreaktion

25 Wie beschrieben soll die Bindung eines DNA-Analyten direkt oder indirekt
zu einem nachweisbaren Signal, z.B. zu einem Lichtsignal führen. Dies kann
beispielsweise durch Absorption, ein Anregungslicht (Fluoreszenz) oder
durch Photonemission (Lumineszenz) erfolgen. Zur Signaldetektion wird
30 vorzugsweise ein CCD-Chip verwendet, der vorzugsweise direkt unter dem
Träger plaziert wird. Die Anregungslichtquelle wird vorzugsweise über dem
Träger plaziert und es wird entsprechend im Durchlichtverfahren gemessen.

- 20 -

Jedes Lichtsignal kann auf dem CCD-Chip erfaßt werden, und zwar nach Intensität und bei Bedarf auch nach Wellenlänge (Farbe) differenziert. Das aufgenommene Spektrum kann qualitativ oder quantitativ ausgewertet werden. Zudem läßt die Unterscheidung von Wellenlängen und Intensitäten 5 auch eine Unterscheidung von Signalquellen zu.

Die Anregungslichtarten für das Nachweisverfahren müssen je nach Anforderungen monochromatisch (z.B. Laserlicht für Fluoreszenzanregung) oder heterogen (z.B. Weißlicht für Absorptionsmessung) gewählt werden.

10

5. Verbesserungen und Vorteile gegenüber vorhandenen Systemen



15

Durch die neuen Träger werden die nachfolgend aufgeführten Nachteile von maskenbasierten Photolithographieverfahren oder dem in situ-Spotten überwunden.

20

* Das Prinzip der flächigen Benetzung der gesamten Chipoberfläche mit Fluid erlaubt keinerlei Multiplexing in der Produktion. So erhöht sich die Zahl der Herstellungszyklen für 20 Basen lange Oligos bei einer Verwendung von Dinukleotiden ($4^2 = 16$ Möglichkeiten) von $4 \times 20 = 80$ Hybridisierungsschritten auf $16 \times 10 = 160$, was eine Verdoppelung bedeutet. Das Gleiche gilt natürlich auch für die zwischengelagerten Waschzyklen.

25

* Die Synthese der photoaktivierbaren Basen an die planare Chipoberfläche, ebenso wie die benötigten Waschschrifte bei der Chipherstellung sind, außer durch platz- und handhabungsintensive Tauchvorgänge (Chip wird in Flüssigkeit getaucht) oder flüssigkeitsintensive Spülvorgänge entlang der Oberfläche (z.B. Zentrifugationsprinzip aus der Halbleitertechnik), nicht realisierbar, was von der Geräteentwicklung her gesehen ein sehr großes Miniaturisierungs- und Automatisierungshemmnis darstellt.



- 21 -

- * Bei der anschließenden DNA-Sequenz-Detektion ist eine gleichmäßige Verteilung der Probe auf der Chipoberfläche aufwendig (keine einfachen und damit zuverlässigen Mischverfahren möglich) und es Bedarf einer entsprechend großen Menge an Proben-Fluid. Die Suche nach einem seltenen Ereignis in der Probe ist nicht möglich, da ein ausreichender Kontakt aller Probenbestandteile mit allen spezifischen Meßpunkten nicht gewährleistet werden kann.

5.1 Reduktion der Produktionszeiten durch Multiplexing beim Synthetisieren

10

Der wesentliche Fortschritt der neuen Träger liegt in der Möglichkeit der drastischen Reduktion der Herstellzeiten bei der individuellen Synthese der Rezeptor-bestückten Träger durch ein entsprechendes Multiplexen zwischen Rezeptorbausteinen als Einsatzstoffen und den Kanälen.

15

Für die ortsspezifische Erzeugung einer Vielzahl an unterschiedlichen Rezeptorsequenzen, z.B. Basen-Sequenzen einer bestimmten Länge (z.B. 20 Basen) auf einer planaren Oberfläche mittels örtlich hochauflösender Photoaktivierung benötigt man in jeder Ebene (Rechenbeispiel: 20 Basen in jeder Basen- Sequenz) des DNA-Chip-Arrays 4 (bedingt durch die vier verschiedenen Basen) Syntheszyklen. Für 20 Basen- Ebenen sind es folglich $4 \times 20 = 80$ Zyklen. Verwendet man auf der gleichen Oberfläche Dinukleotide (2 Basen) so entstehen 2 Ebenen auf einmal, allerdings sind für diese zwei Ebenen $4^2 = 16$ Syntheszyklen notwendig. Für 20 Ebenen werden folglich $10 \times 16 = 160$ Syntheszyklen anstelle von 80 Zyklen benötigt, was eine Verdoppelung der Produktionszeiten bedeutet. Bei der Verwendung von Trinukleotiden (3 Basen) verstärkt sich dieser Effekte auf mehr als die fünffache Anzahl an Zyklen. Somit ist bei einer einfachen planaren Oberfläche die Verwendung von einzelnen Basen als die schnellste Möglichkeit zur photoaktivierten DNA-Chip Erzeugung gegeben. Es besteht keine Möglichkeit die Anzahl an Syntheszyklen zu reduzieren.

- 22 -

Bei der Synthese des opto-fluidischen Trägers besteht im Unterschied hierzu die Möglichkeit, die Einsatzstoffe, sprich die Basen oder die unterschiedlichen Varianten der Di- ($4^2 = 16$ Kombinationen) oder Trinukleotide ($4^3 = 64$ Kombinationen) auf verschiedene Kanäle zu verteilen. D.h., zumindest in den unteren - "trägernahen" - Ebenen wird je Kanal nur immer eine Base bzw. eine der möglichen Basen-Sequenzen eingebracht. Je nach Festlegung der insgesamt zu erzeugenden Basen-Sequenzen in den Kanälen des Trägers kann es sein, daß in den oberen Ebenen dieses Prinzip teilweise aufgehoben werden muß, sprich für eine Basen-, Di- oder Trinukleotid- Ebene muß mehr als eine Base oder Oligo durch einen der Kanäle fließen. Dadurch erhöht sich auch hier die Anzahl der Synthesezyklen ggf. wieder etwas. Insgesamt bleibt jedoch eine sehr große Reduktion der Herstellzeiten auf theoretisch 1/4 der Zyklen bei einfachen Basen, 1/8 der Zyklen bei Dinukleotiden und auf 1/16 der Zyklen bei Verwendung von Trinukleotiden als Einsatzstoffe bei der Rezeptor-Synthese (und so weiter bei längeren Oligos). Die Anzahl der für einen spezifischen Träger benötigten Zyklen ist für jeden Träger individuell und kann nur als statistischer Mittelwert angegeben werden, wenn die Anzahl an Reaktionsbereichen auf bzw. in dem Träger, die Anzahl an parallelen Kanälen und die Länge der auf dem Träger zu synthetisierenden Oligos vorgegeben ist. Die Optimierung der Synthesezeiten eines Trägers soll mittels eines zu entwickelnden Softwaretools (z.B. CAMS Computer Aided Multiplexing Synthesis) erfolgen, welches in die Steuerung des zu entwickelnden Analysesystems bzw. in den angekoppelten Rechner integriert wird.

5.2 Reduktion der Einsatzstoffe und Qualitätssicherung

Die Verwendung von Kanälen reduziert die benötigte Fluidmenge und erhöht gleichzeitig die Qualität sowohl bei der Träger-Synthese, als auch bei der anschließenden Detektion einer Probe, im Vergleich zur Verwendung einer einfachen Fläche sehr stark. So ist das gleichmäßige Benetzen von Kanälen

- 23 -

strömungstechnisch sehr einfach, verbraucht wenig Fluid und ist daher sehr leicht miniaturisier- und automatisierbar. Dies gilt insbesondere auch für die benötigten Waschvorgänge der Kanäle mit einer ausreichenden Qualität.

- 5 Durch die Wände der Kanäle, welche im Prinzip den Zwischenraum zwischen zwei Reaktionsbereichen im Träger-Array bedecken, wird das benötigte Fluid bereits um 50% reduziert. Dies gilt sowohl für das Beschichten des Trägers in der Produktion, das Synthetisieren der Rezeptoren als auch für den "Probenauftrag" für die Analyse. Eine weitere
10 Reduktion der Fluidmengen erfolgt durch die gute Benetzung der Kanalwände durch ein durchströmendes Fluid und vor allem durch die effektiven Waschvorgänge, welche zum Beispiel durch "reinigende" Gasblasen in den Kanälen stark verbessert werden können. Eine gute, statistisch ausreichende Verteilung der Probe auf einer Fläche ist dagegen
15 nur mit einer sehr großen Probenmenge realisierbar.

Ein weiterer Vorteil der Kanäle liegt in den kürzeren Zykluszeiten, welche durch die kleineren Fluidvolumina und die damit verbundenen schnelleren chemischen Reaktionen und Abläufen entstehen. Dies hat sowohl kürzere
20 Synthese- als auch Hybridisierungszeiten zur Folge.

Zusätzlich wird hierdurch eine deutliche Fehlerreduktion sowohl bei der Produktion wie bei der Detektion erzielt, was die Zahl der auswertbaren Messungen pro Material- und Zeiteinsatz weiter erhöht und die Grundlage
25 für eine Qualitätssicherung bildet, welche auf genau definierbare und reproduzierbare Strömungsvorgänge aufbaut.

Die einfache Miniaturisierung und Automatisierung der Abläufe in den neuen Trägern bilden die Basis für eine einfache Miniaturisierung und
30 Automatisierung des gesamten neuen Analysesystems, welches auf den Trägern aufbaut.

- 24 -

5.3 Dreidimensionale Reaktionsoberflächen

Durch eine geeignete Auslegung der Querschnittsgeometrie der einzelnen Kanäle läßt sich die nutzbare Reaktionsoberfläche vergrößern. Die Größe dieser Fläche ist für die Anlagerung der Oligos bei der Produktion ebenso von Bedeutung wie für die Anlagerung der vorbeiströmenden DNA-Fragmente aus der Probe und der daraus resultierenden Intensität der Lichtsignale bei erfolgter Hybridisierung.

So hat ein rechteckiger Kanal, gleiche Höhe wie Breite vorausgesetzt, bei einer Nutzung der Wände und der Decke die vierfache Reaktionsoberfläche bei einer identischen Grundfläche, sprich dem gleichen Platzbedarf in den zwei Dimensionen eines planaren Trägers. Selbst wenn man die Kanäle, aus strömungstechnischen Anforderungen heraus, innen rund auslegt (zum Beispiel bessere Reinigungsmöglichkeiten durch Gasblasen im Kanal), bleibt noch eine etwa dreifache Reaktionsoberfläche im Vergleich mit einer planaren Oberfläche. Durch die Nutzung dieser dreidimensionalen Strömungsgeometrie kann der Einsatzstoffbedarf (Produktion und Analyse) weiter reduziert werden.

Ein anderer Effekt läßt sich ebenfalls durch die Querschnittsgeometrie der Kanäle beeinflussen: Die Lichtbrechung am Übergang vom Innenraum der Kanäle in das umgebende Material des Trägers. So hat jede Krümmung entweder einen fokussierenden oder streuenden Einfluß auf die Ausbreitungsrichtung des Lichtes. So kann man beim Träger durch eine entsprechende Wahl der Ober- und Unterseite der Strömungskanalgeometrie die Lichtwege optimieren.

5.4 Parallele CCD-Chip Detektion

Das Messen der Lichtsignale aller Reaktionsbereich des Trägers "auf einmal" nutzt das ständig wachsende Potential der hochauflösenden CCD-Kamera

- 25 -

Chips. Diese erlauben die Detektion aller Lichtsignale zum Reaktions- bzw. Hybridisierungsnachweis in einem einzigen Meßvorgang. Hierfür stellen aktuelle Farb-CCD-Chips auf einer Fläche von 40 x 40 mm etwa 3000 x 3000 Pixel mit einer Pixelgröße von etwa 10 x 10 µm zur Verfügung. Der Stand der Forschung ist bereits bei entsprechenden CCD-Chips mit ca. 4000 x 6000 Pixeln. Die Signaldetektion erfolgt in Bruchteilen einer Sekunde für alle Pixel synchron. Damit ergibt sich auch für die beschriebene Applikation der CCD-Chip Technologie ein großes Wachstumspotential und die parallele Detektion von 10^6 individuellen Reaktionsbereiche im Träger ist technisch machbar. Dadurch werden die zeitaufwendigen Scann-Vorgänge herkömmlicher Systeme vermieden und die reine Meßzeit reduziert sich auf ein Minimum, welche im Verhältnis zu anderen Verfahrensschritten völlig bedeutungslos wird.

Das Bearbeiten der anfallenden Datenmengen ist, durch die Entwicklung der Leistungsfähigkeit bei gleichzeitigem Preisverfall von modernen Rechnersystemen, problemlos möglich.

5.5 Direktdetektion ohne Optik

Die direkte Detektion der Lichtsignale, ohne Optik, durch einen CCD-Chip hat den Vorteil einer wesentlich niedrigeren Energiemenge, welche das Licht für eine fehlerfreie Detektion benötigt. Eine solche Anordnung soll - in einem anderen Zusammenhang untersucht - lediglich 10% der Anregungslichtmenge einer vergleichbaren Anordnung mit einer Optik verbrauchen. Anders ausgedrückt, die Optik schluckt 90% der Lichtenergie. Durch die geringere Lichtintensität werden unerwünschte Streulichteffekte im - die Kanäle umgebenden - Träger, ebenso wie eine eventuelle notwendige Kühlung der verwendeten Lichtquelle, stark reduziert. Außerdem bedeutet der Wegfall einer Optik eine große Platzersparnis sowie eine Verringerung der Herstellkosten für die Detektionseinheit.

- 26 -

Aufwendige Bewegungseinrichtungen für den Träger oder die Detektionseinheit, wie sie in Scannern notwendig sind, entfallen ebenfalls völlig. Die vorgegebenen Abmessungen der CCD-Chips (mehrere cm²) ermöglichen die Verwendung einer sehr großen Zahl an parallelen Kanälen (mehrere 100) mit einer moderaten Kanalgröße (im 10-100 µm Bereich).

5.6 Disposable Träger

Die Träger können als einfache Disposables (Einweg-Chips) ausgeführt werden. Prinzipiell sind sowohl Glas-, Silizium-, Metall-, Keramik- oder Kunststoff-Chips (kostengünstige Spritzguß-Verfahren) sowie andere Ausführungen möglich.



Die Biochips anderer Technologien sind ebenfalls als Disposable für wenige Messungen ausgelegt. Hier spricht jedoch der aufgrund der aufwendigen Herstellung der Chips sehr hohe Preis meist gegen das Wegwerfen des Chips nach nur einer oder ein paar Messungen.

5.7 Flexibilität der Anwendung

Die schnelle und kostengünstige Produktion ermöglicht eine Vielfalt von individuellen Anwendungen, bei denen z.B. unter Berücksichtigung von Sequenz- und Gendatenbanken im Internet gezielt Oligonukleotid-Arrays synthetisiert werden.



Durch die Verwendung eines einzigen, vielfach gewundenen oder spiralförmigen Kanals könnte eine Hybridisierung im (langsam) Durchfluß etabliert werden, die auch die Detektion von seltenen Ereignissen (z.B. selten exprimierte Gene) ermöglicht. Damit würde ein chromatographisches Prinzip in die DNA Array Technologie eingeführt werden.



- 27 -

Durch die Verwendung von Di-, Tri- oder längeren Oligonukleotiden als Synthesebausteinen ist eine weitere Reduktion der Herstellungszeiten erreichbar. Vor allem für einfachere Arrays können Syntheseeinheiten direkt beim Kunden zur Anwendung kommen und damit die Zusammensetzung des
5 Arrays endgültig individualisieren.

Die große Flexibilität der Technologie ist auch im Hinblick auf die Erkenntnis von Bedeutung, daß sich die Gene einzelner Individuen sehr stark unterscheiden, so daß man keinen generellen Genkatalog für alle Spezies
10 anlegen kann. Der Träger eröffnet hier die Möglichkeit, zum Beispiel in einem ersten Meßzyklus die Basisdaten, wie sie im Internet - frei zugänglich oder nur spezifisch für den Systemkunden - bereitgestellt sind mit den individuellen Unterschieden eines Patienten abzugleichen und aus den Ergebnissen einen entsprechenden zweiten DNA-Array zu bilden, welcher
15 die eigentlichen Tests auf das Individuum angepaßt durchführt.

Die erfindungsgemäße Lösung kann auch für die Synthese von Peptidsequenzen in den Kanälen verwendet werden. Damit würden für eine Vielzahl von Anwendungen hoch komplexe und zugleich kostengünstige
20 Peptidarrays bereitgestellt werden.

6. Überblick über einige Aspekte der Erfindung

6.1 Ausführungsvarianten des Trägers

Bei der Gestaltung ebenso wie bei der Fertigung der Träger gibt es eine Vielzahl von Ausführungsvarianten. Bei der Anordnung der Kanäle im Träger über der Fläche der Detektionseinheit ist die Verwendung nur eines Kanals ebenso denkbar wie die Anordnung einer Vielzahl an parallelen Kanälen. So
25 sind auf einer Fläche von 25 x 37 mm fertigungstechnisch problemlos 500 Kanäle (Stand der Technik: 500 parallele Kapillaren mit einem Durchmesser von 900 nm) mit einer Länge von 37 mm und jeweils etwa 750

- 28 -

Reaktionsbereichen anzugeben. Die gleiche Anzahl an Reaktionsbereichen ($500 \times 750 = 375.000$) ließe sich auch in einem einzigen schlangenförmigen Kanal mit etwa 20 m Länge unterbringen.

5 Der Vorteil nur eines Kanals liegt in der Präsentation der Probe an allen Meßpunkten des Arrays und ist daher für die Suche nach seltenen Bestandteilen besonders geeignet. Ein Vielzahl an parallelen Kanälen hat den Vorteil, daß sich die Produktionszeiten bei der Träger-Synthese durch das Multiplexen von Einsatzstoffen und Kanälen sowie alle Strömungsvorgänge 10 minimieren lassen. Deshalb ist diese Kanalanordnung für die Träger-Synthese sowie alle Analysen mit einer ausreichenden Anzahl an Kopien jedes Analyten in der Probe zu bevorzugen.



15 Um beide Vorteile in einem Träger zu nutzen ist es möglich die Einsatzstoffe bei der Träger-Synthese mittels paralleler Fittings am Zugang zu den Kanälen einzubringen, obwohl der Kanal von der Probeneingabe an nur aus einem einzigen, langen Mikrokanal besteht. Dieser Effekt kann auch durch die Integration von Ventilen in den Träger oder die umgebenden 20 Gerätekomponenten erfolgen. So hat die Firma Biacore fluidisch angesteuerte Ventile in einem zweiteiligen Spritzguss-Chip durch eine Membran realisiert, welche von unten in die Kanäle auf der Oberseite des Chips drückt und so die Kanäle verschließt.



25 Als Anordnung für die Kanäle über der Detektorfläche ist eine Vielzahl an Strukturen und Mikrokanalverläufen möglich. Für eine hohe Parallelität der fluidischen Vorgänge sind beispielsweise parallele oder "snakeförmige" Strukturen naheliegend. Die Aufteilung der Kanäle sollte hierbei nach dem Dualprinzip erfolgen, wo aus jedem Kanal zwei neue entstehen und alle Kanäle gleich lang sind. So erreicht man nach 10 Teilungen bereits $2^{10} = 30 2048$ Kanäle. Spiralförmige Anordnungen haben den Vorteil, dass sie weniger turbulente Strömungsvorgänge aufweisen und besser zu reinigen sind. Ihr großer Nachteil liegt in der Zu- bzw. Abführung, welche in der

- 29 -

dritten Dimension nach oben oder unten erfolgen muß, was fertigungstechnisch und optisch eher ungünstig ist.

Als Material für die Träger ist beispielsweise Glas, Silizium, Keramik, Metall

5 oder/und Kunststoff möglich. Der Aufbau kann in zwei Schichten erfolgen, welche zum Beispiel durch Kleben oder Bonden aneinandergefügt werden

können oder nicht. Die Struktur der Kanäle kann hierbei entweder nur in die eine, oder aber in beide Seiten bzw. Hälften eingebracht werden. Hierfür sind als Fertigungsverfahren u.a. Laser oder Präzisionsfräsen verwendbar.

10 Besonders kostengünstig ist Spritzguß, welcher in einer ausreichenden Qualität gefertigt werden kann. Weitere Verfahren sind die LIGA-Technik oder Heißformen.

6.2 Träger - Synthese

15 Für die Synthese der individuellen Fänger-Rezeptoren, z.B. Oligos, auf den Reaktionsbereichen im Träger-Array gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten.

Der Kunde ersteht fertige Träger vom Hersteller mit einer vorgegebenen Auswahl an immobilisierten Basen- Sequenzen, oder er synthetisiert sich in 20 einer Syntheseeinheit seine selbstgewählten Sequenzen auf ungelabelte Träger. Informationen über entsprechende Sequenzen können zum Beispiel aus Datenbanken im Internet entnommen werden, die hier frei oder auch speziell durch den Träger- Hersteller bereitgestellt werden.

25 6.2.1 Syntheseeinheit

Die Syntheseeinheit besteht aus einer geeigneten Lichtquelle, welche die Reaktionsbereiche im Träger-Array bei der Synthese der Rezeptoren, z.B.

Basen oder Basen-Sequenzen, an der Trägeroberfläche bzw. den 30 Kanalwänden ortsspezifisch hochgenau und exakt auflösend bestrahlt. Wie

bereits unter 4.4 erwähnt, kann die Belichtung mittels einer programmierbaren Lichtquellenmatrix erfolgen. Verwendet werden kann

- 30 -

auch eine Photolithographie- Einrichtung, wie sie in der Halbleiter- Chip- Produktion für das lichtaktivierte Ätzen von Si- Wafern zum Einsatz kommt.

6.2.2 Fertige Träger - Synthese beim Hersteller

5

Beim Vertrieb fertiger Träger erfolgt die Synthese beim Hersteller. Dieser benötigt hierfür eine entsprechend leistungsfähige Syntheseeinheit, welche möglichst lange Oligos (3 oder mehr Basen lang) als Einsatzstoffe verwendet, die parallel in die Kanäle eingebracht (eingespritzt) werden, und so die Synthesezeiten pro Träger minimieren (Multiplexing). Hierbei ist es möglich, in den Trägern spezielle Zugänge vorzusehen, mit dem Ziel möglichst viele parallele und damit kurze Kanäle zu erhalten, unabhängig davon, welche Kanalstruktur für den Analysevorgang vorgesehen ist.

15

6.2.3 Einsatzstoffe im Träger

20

Für Anwendungen, wo es nicht auf eine schnelle Synthese der Träger, aber auf eine individuelle Gestaltung der Arrays ankommt, ist eine Bereitstellung der Einsatzstoffe (G, A, C, T und Puffer etc.) direkt im Träger in entsprechenden Reservoirs möglich. Die überflüssigen Einsatzstoffe müssen in einer entsprechenden Kammer im Träger aufgefangen werden. Das Volumen einer solchen Kammer ist durch eine Ausdehnung in der dritten Dimension nach oben oder unten problemlos auf ein Vielfaches des gesamten Kanalvolumens auslegbar. Eine Anwendung dieser Träger- Variante ist gerade für Forschungslabors, aber auch kleine Arztpraxen denkbar.

25

Das Prinzip der Kapillarkraft kann hierbei in einer möglichen Ausführungsvariante direkt für den Fluidtransport im Träger verwendet werden. Jegliche Mechanik würde entfallen und die Befüllung der Kapillaren mit den Einsatzstoffen sowie der Probe könnte über die einfache Verstellung eines Ventils im Träger erfolgen. Die "Abfallkammer" könnte durch die

- 31 -

Einbettung eines geeigneten Vlies-Stoffes eine unterstützende Saugwirkung entwickeln. Um eine Minimierung der benötigten Fluidmengen zu erreichen, sollte bei diesen Einwegströmungs- Ausführungen (keine Zirkulation und damit Wiederverwendung der Einsatzstoffe) auf immer gleich lange Kapillaren geachtet werden. Dies ist ebenfalls von Bedeutung für das Funktionieren der Kapillarkraft als Pumpe.

Ein weitere Variante ist eine vertikale Ausrichtung der planaren Träger, so daß auch Gravitationskräfte für den Fluidtransport im Träger genutzt werden können. Wenn diese Kräfte nicht ausreichen, um alle notwendige Fluidtransporte in den Träger zu realisieren, so sind andere geeignete Pumpmechanismen vorzusehen. Eine Möglichkeit hierzu ist eine elektrophoretische Bewegung der Fluide durch - in den Träger integrierte - Elektroden, oder durch eine Volumenreduktion in Kammern des Träger durch einen entsprechenden Krafteintrag von außen in den Träger (klassische Pumpe).

6.2.4 Einsatzstoffe in der Syntheseeinheit

Die Bereitstellung der Einsatzstoffe für die Träger-Synthese in Vorratsbehältern bietet prinzipiell den Vorteil des Multiplexens von fertigen Basen-Sequenzen und parallelen Kanälen, weshalb diese Ausführungsvariante für (Ultra)Hochdurchsatz-Screening und Träger-Hersteller empfehlenswert ist. Das Multiplexen kann an der Schnittstelle zum Träger erfolgen, in dem eine spezifische Basen- Sequenz für jeden Synthese-Zyklus einen anderen Kanal benetzt. Eine technisch aufwendigere, aber ggf. zuverlässigere Methode ist ein Multiplexen im Gerät durch ein entsprechendes Ventilsystem. Hier ist die Verschleppung zu beachten, welche durch die Verwendung unterschiedlicher Basen- Sequenzen entstehen kann.

- 32 -

Ein weiterer Punkt, welcher berücksichtigt werden muß, ist das Auffangen und Beseitigen des überschüssigen Materials am Ausgang der einzelnen Kanäle. Hier ist sowohl eine Zirkulation (Wiederverwendung des austretenden Materials) als auch eine Beseitigung der austretenden 5 Einsatzstoffe denkbar.

6.3 Analytbestimmung

Die Analyse von Nukleinsäure-Sequenzen erfolgt wie bei anderen 10 Oligonukleotid-Arrays durch Hybridisieren von Nukleinsäuren im Probenmaterial an komplementäre Stränge unter den immobilisierten Oligonukleotiden.

Als eine weitere mögliche Anwendung des Trägers können auch 15 Peptidsequenzen in den Kanälen angekoppelt werden, ebenfalls nach in situ Syntheseprinzipien. Solche Peptide sind zu vielfältigen und teilweise hochspezifischen Bindungsreaktionen mit Peptiden, Proteinen und anderen Substanzen in der Lage, so daß sich das Spektrum potentieller Analyten erheblich ausweiten läßt.

20 Die Synthese im Träger würde erstmals massiv parallele und gleichzeitig kostengünstige Peptid-Arrays für eine Vielzahl von Anwendungen zur Verfügung stellen.

25 6.3.1 Analyten

Beispiele für Analyten sind Nukleinsäuren (DNA, RNA, in Spezialfällen auch 30 PNA). Diese Nukleinsäuren können aus Gesamtgenomen, Fragmenten davon, Chromosomen, Plasmiden oder synthetischen Quellen (z.B. cDNA) gewonnen werden. In einer Ausführungsform kann das Probenmaterial aus dem menschlichen Genom stammen.

- 33 -

Weitere Beispiele für Analyten sind Proteine, Polypeptide und Peptide in allen Erscheinungsformen z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren, Enzyme, Tumorantigene, Serumfaktoren, Antikörper, Carbohydrate, z.B. verschiedene Zucker in Lebensmitteln oder Agrarpflanzen, funktionelle Zucker, Polymere
5 und andere organische Moleküle, z.B. 'drugs of abuse', Pharmaka, Metabolite, Aminosäuren, Transmitter, Pestizide, Insektizide, Lacke, verschiedene Toxine etc.

6.3.2 Varianten zur Bindung an den immobilisierten Interaktionspartner
10 (Rezeptor)

Die Bindung des Analyten an den Rezeptor kann bei Nukleinsäuren durch Hybridisierung von komplementären Nukleinsäuren z.B. längere Moleküle wie cDNA, synthetische Oligonukleotide, PNA, RNA erfolgen. Peptide als
15 Rezeptoren , z.B. synthetische Peptide oder natürliche Peptide können über Protein-Protein oder Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen an den Analyten binden.

6.3.3 Varianten zur Signalerzeugung

20 Zwei Prinzipien zur Signalerzeugung werden bevorzugt eingesetzt, nämlich:
die direkte Detektion eines vorher oder in der Reaktion markierten Analyten
(bevorzugte Methode in der Nukleinsäureanalytik mittels Hybridisierung) und
die indirekte Detektion durch Kompetition des Analyten bzw. der
25 Zielsequenz mit einem markierten Standard. Die erste Variante ist für einige
Anwendungen gut etabliert, für Diagnostik z.B. von Serumkomponenten
aber eher schlecht geeignet, die mit Peptid-Arrays auch im Träger möglich
ist. Die zweite Variante ist für diese Anwendungen daher vorzuziehen,
außerdem erlaubt sie prinzipiell eine einfachere Probenvorbereitung durch
30 den Anwender.

- 34 -

Eine direkte Detektion kann erfolgen durch Markierung der Analyten mit einem Farbstoff für die Absorptionsmessung, einem Fluoreszenzfarbstoff, Markierung der Analyten mit Reporterenzym, anschließend Reaktion (z.B. Chemo- oder Biolumineszenz), selektive Markierung des gebundenen
5 Analyten, z.B. bei Nukleinsäuren durch interkalierende (Fluoreszenz-) Farbstoffe, Doppelstrang-bindende Proteine oder Doppelstrang-bindende Antikörper oder eine sekundäre Detektion des gebundenen Analyten mit einer zweiten Komponente, z.B. bei PNA-DNA Hybriden durch DNA spezifischen Antikörper. Als markierte Standards verwendet werden können
10 enzymgekoppelte Standards (z.B. Chemo- und Biolumineszenz mit alkalischer Phosphatase, Peroxidase etc.) oder Fluoreszenz-) Farbstoff gekoppelte Standards. Proteinstandards können als Fusionsproteine mit einem Reporterenzym (siehe oben) oder einem autofluoreszierendem Protein (z.B. GFP), z.B. für rekombinante Antikörper, Protein-Hormone,
15 Wachstumsfaktoren etc. eingesetzt werden.



6.4 Bereitstellung des Probenmaterials

Für die Bereitstellung des Probenmaterials gibt es ebenfalls wieder
20 unterschiedliche Ausführungsvarianten. Für die eigentliche Detektion ist die Art der Bereitstellung nicht relevant, da an der Schnittstelle immer in Flüssigkeit gelöste DNA-Fragmente in ausreichender Menge für die angestrebte Untersuchung bereitzustellen sind.



25 6.4.1 Externe Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung kann entweder manuell im Labor, in einem getrennten Analysesystem oder in einer in das gleiche System integrierten Vorbereitungseinheit erfolgen. Die detektionsbereite Probe wird dann mittels
30 manuellem oder automatischem Pipettieren oder vergleichbaren Verfahren in den Träger eingebracht.

- 35 -

6.4.2 Probenvorbereitung im gleichen Träger "all in one"

Gerade, wenn das Multiplexen bei der Träger-Synthese zur Reduktion der Produktionszeiten verwendet wird, können gleiche oder sogar kürzere Zeiten für die Rezeptorsynthese erreicht werden, als z.B. für die DNA-Amplifizierung der Probe mittels PCR notwendig wäre. Dadurch wird eine Integration einer PCR in das Synthese- System oder sogar in den Träger für viele Anwendungen sinnvoll.

- 10 Neben der zeitintensiven PCR ist auch der vorgelagerte Zellaufschluß zum Beispiel über gut automatisierbare Verfahren wie Ultraschall oder Hochspannung ebenso wie die DNA-Isolierung integrierbar.

6.5 Detektionseinheit

- 15 Die Auslesung der Lichtsignale für die Nachweisreaktionen im Träger-Array soll in einer Detektionseinheit erfolgen, wobei die Anregungslichtquelle (Fluoreszenz, Lumineszenz oder Absorption als optischer Nachweis) dem CCD-Chip zur Lichtsignalmessung direkt gegenüber angeordnet wird. Der Träger-Array befindet sich zwischen Lichtquelle und Detektions-Chip (Sandwichbauweise). Als Anregungs-lichtquelle kann eine Belichtungsmatrix herangezogen werden. Die räumliche Anordnung dieser Einheit kann je nach Bedarf erfolgen (z.B. Nutzung der Gravitation für Strömungsvorgänge im Chip). Durch diese möglichst kompakte Bauweise werden die Lichtlaufwege und damit auch die benötigte Lichtintensität minimiert. Auf die Verwendung einer aufwendigen, platzintensiven, lichtschluckenden und teuren Optik soll sowohl auf der Anregungs-, als auch auf der Detektionsseite verzichtet werden.

- 36 -

6.5.1 Temperatur bei der Hybridisierung

Die Temperierung (derzeit typischerweise bei 60 °C - neueste Entwicklungen ermöglichen auch schon eine Hybridisierung bei 25 °C mit Niedrigsalz-
5 Bedingungen) bei der Hybridisierung kann entweder durch entsprechende Temperaturelemente in der Detektionseinheit oder durch die Anregungslichtquelle bzw. das Anregungslight an sich erfolgen. Temperaturelemente in den Trägern sind ebenfalls möglich.

10 6.5.2 Anregungslichtquelle

Als Lichtquellen kommen je nach den Markern der Analyten (Nachweisverfahren via Absorption oder Fluoreszenz etc.) hochparalleles Licht aus einer Lampe (Weißes Licht), hochparalleles Licht aus einer
15 Blitzröhre, hochparalleles monochromatisches Licht, ein monochromatischer Laserlichtstrich, eine flächige Belichtung mittels Aufweitung des Laserstrahls, ein monochromatischer Laserstrahl oder eine programmierbare Lichtquellenmatrix in Frage.

20 Gegebenenfalls kann ein entsprechendes optisches Gitter oder eine entsprechende Optik zwischen Anregungslichtquelle und Träger-Array vorgesehen sein.

6.5.3 CCD-Kamera Detektion

25 Die Detektionseinheit besteht vorzugsweise nur aus einem CCD-Chip. Diese haben aktuell auf einer Fläche von beispielsweise 25 x 37 mm etwa 2000 x 3000 Pixel (Cannon). Ordnet man auf einer solchen Fläche von 25 x 37 mm etwa 500 parallele Kanäle mit ca. 20 µm Durchmesser an (jede zweite
30 Doppel-Pixelreihe), so erhält man in jedem Kanal 750 Meßpunkte (Felder), wenn man nur jeden zweiten Doppel-Pixel unter dem Kanal nutzt. Damit hätte man 375.000 Reaktionsbereiche auf einem einzigen Träger, wobei

- 37 -

jeder Reaktionsbereich 4 Farb- bzw. 12 Schwarzweiß-Pixel überdeckt und eine Fläche von $20 \times 20 \mu\text{m}$ hat. Die Lichtsignale müssen möglichst dicht am optischen CCD-Chip erzeugt werden, damit eine fehlerhafte Zuordnung von Lichtsignalen und Meßpunkten mit ihrer spezifischen Basen- Sequenz sowie eine Überlagerung benachbarter Lichtsignale ausgeschlossen werden kann. Ansonsten kann eine serielle Detektion sich überlagernder Bereiche erfolgen oder es werden faseroptische Elemente eingesetzt.

Die entstehende Vielzahl an Meßwerten ($4 \times 500 \times 750 = 1.5$ Mio.

Farbsignale bzw. 4.5 Mio. Intensitätswerte zwischen 0 und 4096 Digitalwerten), welche zur Verfügung stehen (aktueller Stand der CCD-Chip Technik), bilden die Basis welche eine umfangreiche Statistik bei der Analyse der detektierten Lichtsignale erlaubt. Das Bearbeiten der anfallenden Datenmengen ist, durch die Entwicklung der Leistungsfähigkeit bei gleichzeitigem Preisverfall von modernen Rechnersystemen, problemlos möglich.

Die Detektion der Nachweisreaktion kann sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen machen und zwar welche Fängermoleküle (Position im Array) haben Anlagerungspartner gefunden (Auswertung der z.B. fluoreszenzmarkierten Labels) und wieviele Fängermoleküle einer Klasse haben einen Hybridisierungspartner gefunden.

Gegebenenfalls kann ein entsprechendes optisches Gitter oder eine entsprechende Optik zwischen dem Träger-Array und dem CCD-Kamera Chip vorgesehen sein.

Wenn die Detektion mit einer CCD-Kamera bzw. einem CCD-Chip keine ausreichenden Signale ergibt, kann die Detektion im Analysesystem auch mittels anderer, empfindlicherer Sensoren erfolgen.

- 38 -

Interessant im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer Inspektionseinheit, wie in der deutschen Patentanmeldung 198 39254.0 beschrieben ist. Diese Inspektionseinheit umfaßt eine elektronisch steuerbare Lichtquellenmatrix und eine der 5 Lichtquellenmatrix zugewandt-gegenüberliegende Lichtsensormatrix, nämlich CCD-Bildaufnehmer.

In diesem Zusammenhang ist es denkbar, daß der Anwender sich seine Träger selbst erzeugt und direkt verwendet. Er lädt sich einfach die 10 benötigten Daten (DNA-Sequenzen) von einer CD-ROM oder aus dem Internet und erzeugt in seiner Belichtungsmatrix-CCD-Einheit seinen individuellen DNA-Chip, benetzt ihn anschließend mit der Probe und liest die Signale aus.

15 Mißt man z.B. jeden zweiten Pixel in dieser Anordnung für die Photoaktivierung, so kann man die Pixel dazwischen, welche in Projektion innerhalb eines Kanals liegen, für eine permanente Prozeßkontrolle verwenden. So kann man z.B. das Einströmen einer Gasblase zwischen zwei Fluiden in einem Kanal individuell und dynamisch verfolgen. Auch ein Färben 20 der Trägerfluide für G, A, C und T wäre denkbar, so daß die Anwesenheit der richtigen Oligos überprüfbar würde und eine Farbveränderung könnte eine Verschleppung signalisieren. Bei der anschließenden Detektion könnte wiederum eine ortsspezifische und wenn notwendig sogar farbspezifische Lichtenregung erfolgen. Hierdurch ergeben sich ganz neue Möglichkeiten für 25 Nachweisverfahren, wie sie derzeit noch nicht vorhanden sind.

Durch die Inspektionseinheit (Belichtungsmatrix-CCD-Einheit) können die Strömungsvorgänge in den Kanälen in einem Träger sowohl während der Produktion - sprich der Oligo-Synthese - als auch während der Analyse 30 überwacht werden. Hierzu können z.B. Reinigungsgasblasen zwischen zwei Fluiden in den Kanälen oder eine Färbung der einzelnen Fluide verwendet werden.

- 39 -

Für die lichtinduzierte Abspaltung von Schutzgruppen während der Synthese von DNA-Oligos auf oder in dem Träger kann eine Belichtungsmatrix dienen, die die notwendige Wellenlänge von z.B. 360-370 nm erzeugt und überträgt.

5

Die Detektion der Nachweisreaktion im Träger kann ebenfalls in der Inspektionseinheit erfolgen. Wenn der Nachweis über Fluoreszenzmarker realisiert wird, müßte hierzu ggf. die Hintergrundbeleuchtung gewechselt werden (automatisch möglich), wobei optische Filter oder/und Glasfaserelemente ("Taper") verwendet werden können. Gegebenenfalls kommen hier auch neue Detektionsverfahren zum Einsatz, welche erst durch die extrem flexible, individuelle Anstrahlung und Detektion des einzelnen Reaktionsbereichs möglich werden.

10

15 Für eine Standard-Hybridisierung von DNA-, RNA- und PNA-Strängen miteinander benötigt man eine Temperatur von ca. 55 - 65°C. Im einfachsten Fall kann diese Temperatur durch die abgestrahlte Energie der Belichtungsmatrix erzeugt werden (Abwärme und Wellenlänge). Damit ließe sich eine weitere Kompaktierung der Anordnung erreichen.

20

8. Exemplarische Ausführungsformen

Die Synthese von DNA-Molekülen in Kanälen kann unter Verwendung von Standard-Synthonen, z.B. Phosphoramidit-Bausteinen, mit geeigneten 25 Schutzgruppen, z.B. Dimethoxymethyl (DMT) erfolgen. Ausgehend von einem an die Festphase gekoppelten Linker kann eine entsprechende fluidische DNA-Synthese erfolgen.

30

- 40 -

Dieses Format kann für die bevorzugte Ausführungsform der Erfindung mit einer lichtabhängigen Steuerung der DNA-Synthese kombiniert werden. Dazu sind Schutzgruppen bekannt, die eine lichtabhängige Entschützung erlauben, so daß die Schutzgruppe, die meist am 5'-Kohlenstoffatom des
5 Synthons gebunden ist, durch Licht geeigneter Wellenlänge abgespalten wird. Auf diese Weise ist in Kapillaren die Synthese von Nukleinsäuren mit einer Länge von 18 oder mehr Nukleotiden möglich.

Durch Ablösung des synthetisierten DNA-Oligomere, wie es durch
10 Verwendung geeigneter Linker möglich ist, können die Reaktionsprodukte z.B. durch Hochleistungflüssigchromatographie (HPLC) analysiert werden. Dabei läßt sich über den Anteil der Vollängenprodukte die Effizienz der kapillaren DNA-Synthese zeigen.

15 Für die lichtabhängige DNA-Synthese wird der Reaktionsbereich auf dem Träger orts- oder/und zeitspezifisch mit einer geeigneten Lichtquelle belichtet, z.B. mit einer Quecksilberdampflampe, Laserlicht (z.B. Stickstofflaser mit 373 nm) oder mit einer UV-LED. Ebenso geeignet sind auch andere Lichtquellen, die eine ausreichend energiereiche Strahlung
20 aufweisen.

Fig. 1 zeigt in einer stark schematisierten Draufsicht einen Träger nach der Erfindung.

25 Fig. 2 zeigt Beispiele für Kanalanordnungen in einem Träger nach der Erfindung.

Fig. 3 zeigt eine schematische Darstellung eines Trägers in einer
30 Inspektionseinheit aus programmierbarer Lichtquellenmatrix und CCD-Matrix.

- 41 -

Fig. 4 zeigt eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für ein lichtgestütztes integriertes Synthese- und Analyseverfahren und

5 Fig. 5 zeigt den Aufbau aus Fig. 4 für eine fluidische Individualisierung von Reaktionsbereichen.

Figur 1 zeigt einen den transparenten Träger in einer Draufsicht in stark schematisierter Weise. Man erkennt die parallel zueinander verlaufenden
10 Kanäle 1, beispielsweise 500 Kanäle mit einer Länge von 37 nm. Mit T, G, A, C sind in Fig. 1 Reservoirs für die einzelnen Einsatzstoffe (Basen) bezeichnet. Mit 3 ist der Gaseinlaß bezeichnet. 5 kennzeichnet ein Ventil. 7 kennzeichnet die Probeneingabe und mit 9 ist ein Zugang für weitere Synthesechemikalien sowie Reinigungs-/Waschflüssigkeit bezeichnet.

15 In Figur 2 sind schematisch weitere Beispiele für alternative Kanalanordnungen dargestellt.

Figur 3 zeigt den Träger nach Fig. 1 in einer Inspektionseinheit aus
20 programmierbarer Lichtquellenmatrix, z.B. einer LCD-Matrix und einer CCD-Detektionsmatrix.

In Figur 4 ist eine erfindungsgemäße Vorrichtung mit einem auswechselbaren Träger 40 dargestellt, wobei der prinzipielle Aufbau
25 unabhängig davon ist, ob der Träger in jedem Zyklus oder erst bei Verschleiß ausgewechselt wird. In letzterem Fall findet eine Reinigung und anschließende Wiederverwendung derselben Kanäle statt. Dargestellt ist eine programmierbare Lichtquellenmatrix 30. Deren Programmierbarkeit kann in die Systemkomponente 20, die aus einem Rechner bzw. einem Computer besteht, integriert sein, so daß nur eine frei ansteuerbare Lichtquellenmatrix als Komponente 30 notwendig ist. Diese Lichtquellenmatrix 30 strahlt Licht
30 definierter Wellenlänge und Intensität auf beliebig ansteuerbare Orte einer

- 42 -

zumindest zweidimensionalen Matrix, die der hochparallelen Belichtung der Reaktionsbereiche im Träger 40 dient. Besagter Träger 40 wird durch die Lichtquellenmatrix 30 mit dem rechnergesteuerten Lichtmuster bestehend aus Energiewellen in allen Reaktionsbreichen individuell bestrahlt. Über das 5 fluidische Anschlußsystem 64 werden die vom Fluidikmodul 60 bereitgestellten Fluide in den Träger 40 transportiert und in dessen in der Zeichnung nicht dargestellten Mikrostruktur in geeigneter Weise an die Reaktionsbereiche weitergeleitet. Dadurch wird der Träger 40 zu einem 10 opto-fluidischen Mikroporzessor. Dieser kann entweder nach jeder Anwendung gewechselt werden oder nach jeder Anwendung gereinigt und nur zu Servicezwecken bei Verschleiß gewechselt werden.



Das eintretende Licht kann zum Beispiel für Absorptionsmessungen, die Aktivierung von Photoreaktionen oder das Anregen von Fluoreszenz genutzt 15 werden.



Das aus dem Träger 40, bzw. dem opto-fluidischen Mikroprozessor austretende Licht kann beispielsweise das im Durchlicht den Träger passierende Licht der Lichtquellenmatrix 30 sein. Es kann sich dabei jedoch 20 auch um Lichtsignale handeln, die in den einzelnen Reaktionsbereichen des Trägers 40 durch beispielsweise Fluoreszenz oder Lumineszenz erzeugt werden.

Die Detektormatrix 50, die zum Beispiel aus einem CCD-Chip mit oder ohne 25 Optik besteht, ist so gegenüber einer Lichtquellenmatrix 30 mit einem dazwischen liegenden Träger 40 angeordnet, daß dadurch eine dreifache Matrixanordnung aus Licht-, Träger und Detektormatrix entsteht.

Das Fluidmodul 60 dient der Versorgung des Reaktionsträgers 40 zum 30 Beispiel mit Einsatzstoffen, Schutzgasen, Chemikalien, wie Lösemitteln, etc. und Probenmaterial. Das Fluidmodul 60 besteht aus Tanks 61, die durch Pumpen 62 und Ventile 63 in geeigneter Weise entleert werden. Die Tanks

- 43 -

können einzeln oder im Cluster ausgewechselt oder neu gefüllt werden. Permanent benötigte Fluide, wie beispielsweise Schutzgas, können auch mittels Leitungen kontinuierlich (ohne Tanks im System) zugeführt werden. Der fluidische Abfall der verschiedenen Verfahren kann entweder im Träger
5 40 in integrierten Tanks oder in einem Abfallsystem 65 oder bei Clustern außerhalb des einzelnen Systems aufgefangen werden.

Ebenfalls dargestellt ist die Systemgrenze 10 der Vorrichtung, die als Einzelgerät oder auch in zentralen oder dezentralen Clustern eingesetzt
10 werden kann. Diese Cluster sind immer informationstechnisch miteinander verknüpft. Die an einem Ort befindlichen Systeme können auch gemeinsam durch manuelle Bedienung oder automatisierte Komponenten mit Energie, Fluiden, wie Einsatzstoffen, Reaktionschemikalien, Schutzgasen und Probenmaterial, sowie mit den benötigten Trägern versorgt werden.

15 Die Systemkomponente 20 in Form eines Computers oder Rechners übernimmt die Steuerung bzw. Regelung des Systems. Hierunter fallen auf der Basis der Berechnung der Sonden- bzw. Rezeptorsequenzen für die einzelnen Reaktionsbereiche die Steuerung der Lichtquellenmatrix 30 sowie
20 der Fluidkomponente 60. Ferner werden die Daten der Dektormatrix 50 erfaßt und ausgewertet.

Jede Vorrichtung kann somit über seine Systemgrenze 10 hinweg mit anderen Vorrichtungen oder Systemen, bestehend aus wiederum einer
25 erfindungsgemäßen Vorrichtung oder anderen Rechnern oder Datenbanken, kommunizieren. Dies kann beispielsweise über Leitungen, Bussysteme oder über das Internet erfolgen. Dabei kann die Kommunikation zentral koordiniert über Leitrechner erfolgen oder als Cluster gleichberechtigter Systeme. Ebenfalls vorgesehen ist eine Datenschnittstelle 21 zur
30 Systemumgebung.

- 44 -

Figur 5 zeigt den Aufbau aus Figur 4 für eine fluidische Individualisierung der Reaktionsbereiche. Wiederum dargestellt ist ein Träger 41. Dieser wird durch das fluidische Entschützungsmodul 32 rechnergesteuert individuell benutzt. Über das fluidische Anschlußsystem 64 werden die vom Fluidmodul 60 bereitgestellten Fluide in den Träger transportiert und in dessen in der Zeichnung nicht dargestellten Mikrostruktur in geeigneter Weise an die Reaktionsbereiche weitergeleitet. Dadurch wird der Träger 41 zu einem opto-fluidischen Mikroprozessor. Dieser kann entweder nach jeder Anwendung gewechselt werden oder nach jeder Anwendung gereinigt und nur zu Servicezwecken bei Verschleiß gewechselt werden.

In diesen Träger kann zum Beispiel von oben oder/und von der Seite Licht für die Anregung von Fluoreszenzreaktionen etc. eingespeist werden.

Das aus dem Träger, bzw. dem opto-fluidischen Mikroprozessor austretende Licht kann beispielsweise durch Lumineszenz an den Reaktionsbereichen erzeugt werden.

Das fluidische Entschützungsmodul 32 kann jeden Reaktionsbereich auf dem Träger 41 mit mindestens einer der Benetzungskomponenten 33 (z.B. Düsen, Kapillaren, etc.) individuell mit Fluiden in Kontakt bringen. Hierdurch können zum Beispiel lokal chemische und biochemische Reaktionen aktiviert werden.

Das Fluidmodul 31 dient der Versorgung des fluidischen Entschützungsmoduls 32 mit Einsatzstoffen oder Chemikalien: Das Fluidmodul 31 ist dem Modul 60 vergleichbar aufgebaut und besteht je nach Bedarf aus Tanks, Leitungen, Ventilen, etc.

Die Detektormatrix 50, die zum Beispiel aus einem CCD-Chip mit oder ohne Optik besteht, ist so gegenüber einem fluidischen Entschützungsmodul 32

- 45 -

mit einem dazwischen liegenden Träger 41 angeordnet, daß dadurch wiederum eine dreifache Matrixanordnung entsteht.

Das Fluidmodul 60 dient der Versorgung des Trägers 41 zum Beispiel mit

5 Einsatzstoffen, Schutzgasen, Chemikalien, wie Lösemitteln, etc. und Probenmaterial. Das Fluidmodul 60 besteht aus Tanks 61, die durch Pumpen 62 und Ventile 63 in geeigneter Weise entleert werden. Die Tanks können einzeln oder im Cluster ausgewechselt oder neu gefüllt werden. Permanent benötigte Fluide, wie beispielsweise Schutzgas, können auch 10 mittels Leitungen kontinuierlich (ohne Tanks im System) zugeführt werden. Der fluidische Abfall der verschiedenen Verfahren kann entweder im Träger 41 in integrierten Tanks oder in einem Abfallsystem 65 oder bei Clustern außerhalb des einzelnen Systems aufgefangen werden.

15 Wiederum dargestellt ist die bereits erläuterte Systemgrenze 10 der

Vorrichtung und die Systemkomponente 20 in Form eines Computers oder Rechners, der die Steuerung bzw. Regelung des System übernimmt. Hierunter fallen auf der Basis der Berechnung der Sondensequenzen für die einzelnen Reaktionsbereiche die Steuerung der Fluidmodule 31 und 60, 20 sowie des fluidischen Entschützungsmoduls 32. Ferner werden die Daten der Detektormatrix 50 erfaßt und ausgewertet.

Jede Vorrichtung kann somit über seine Systemgrenze 10 hinweg mit anderen Vorrichtungen oder Systemen, bestehend aus wiederum einer 25 erfindungsgemäßen Vorrichtung oder anderen Rechnern oder Datenbanken, kommunizieren. Dies kann beispielsweise über Leitungen, Bussysteme oder über das Internet erfolgen. Dabei kann die Kommunikation zentral koordiniert über Leitrechner erfolgen oder als Cluster gleichberechtigter Systeme. Ebenfalls vorgesehen ist eine Datenschnittstelle 21 zur 30 Systemumgebung.

Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Trägers für die Bestimmung von
5 Analyten, umfassend die Schritte

- (a) Bereitstellen eines Trägerkörpers umfassend mindestens einen Kanal,
- (b) Leiten von Flüssigkeit mit Bausteinen für die Synthese polymerer Rezeptoren durch den Kanal oder die Kanäle des
10 Trägerkörpers,
- (c) orts- oder/und zeitspezifisches Immobilisieren der Rezeptorbausteine an jeweils vorbestimmten Positionen in dem Kanal oder in den Kanälen und
- (d) Wiederholen der Schritte (b) und (c) bis die gewünschten
15 Rezeptoren an den jeweils vorbestimmten Positionen synthetisiert worden sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,

20 daß man einen Träger herstellt, der definierte Flächenbereiche mit jeweils gleichen Rezeptorspezies enthält.

3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,

25 daß die Kanäle auf mindestens einer Trägeroberfläche angeordnet sind.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,

30 daß der Träger eine Vielzahl von Kanälen enthält, die vorzugsweise parallel zueinander angeordnet sind.

- 47 -

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Rezeptoren aus Nukleinsäuren und Nukleinsäureanaloga
ausgewählt werden.

5

6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Rezeptorbausteine aus Nukleotiden, Oligonukleotiden,
Nukleotidanaloga und Oligonukleotidanaloga ausgewählt werden.

10

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Rezeptoren aus Polypeptiden ausgewählt werden.

15

8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Rezeptorbausteine aus Aminosäuren und Peptiden
ausgewählt werden.

20

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß das ortsspezifische Immobilisieren der
Rezeptorbausteine durch Belichten erfolgt.

30

25 10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
das Belichten über eine programmierbare Lichtquellenmatrix erfolgt.

- 48 -

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß das orts- oder/und zeitspezifische Immobilisieren der
Rezeptorbausteine durch Benetzung mit einem aktivierenden Fluid
unter steuerbarer Auswahl der aktivierte Positionen erfolgt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Muster der polymeren Rezeptoren durch eine
Computerprogrammierung festgelegt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß man den Träger zur Bestimmung von Analyten in einer Probe
verwendet.

14. Verfahren zur integrierten Synthese und Analytbestimmung an einem
Träger umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen eines Trägerkörpers,
- (b) Leiten einer Flüssigkeit mit darin enthaltenen Rezeptoren oder
Bausteinen für die Synthese von polymeren Rezeptoren über
den Träger,
- (c) orts- oder/und zeitspezifisches Immobilisieren der Rezeptoren
oder Rezeptorbausteine an jeweils vorbestimmten Positionen
auf dem Träger,
- (d) gegebenenfalls Wiederholen der Schritte (b) und (c) bis die
gewünschten Rezeptoren an den jeweils vorbestimmten
Positionen auf dem Träger synthetisiert worden sind,
- (e) Inkontaktbringen des Trägers mit einer Analyten enthaltenden
Probe und
- (f) Bestimmen der Analyten über deren Bindung an die auf dem
Träger immobilisierten Rezeptoren.

- 49 -

15. Verfahren nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Synthese und Analytbestimmung in einer integrierten
Vorrichtung durchgeführt wird, wobei der Synthese- oder/und der
Analytbestimmungsprozeß in einer beliebigen Anzahl von Positionen
auf dem Träger überwacht und geregelt wird.

16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine integrierte Vorrichtung verwendet, umfassend eine
programmierbare Lichtquellenmatrix, eine Detektormatrix, einen
zwischen Lichtquellen - und Detektormatrix angeordneten Träger
sowie Mittel zur Zufuhr von Fluids in den Träger und zur Ableitung
von Fluids aus dem Träger.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß nach der Bestimmung der Analyt wieder vom Träger entfernt
wird.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß mehrere Synthese/Analytbestimmungszyklen durchgeführt
werden, wobei die Rezeptoren für einen nachfolgenden Zyklus auf
Basis der Informationen aus einem vorhergehenden Zyklus
synthetisiert werden.

19. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß für den nachfolgenden Zyklus eine Verlängerung der Rezeptoren
aus dem vorhergehenden Zyklus erfolgt.

- 50 -

20. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß für den nachfolgenden Zyklus ein neuer Träger mit gegenüber
dem vorhergehenden Zyklus modifizierten Rezeptoren synthetisiert
wird.

5
21. Verfahren nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Modifizierung der Rezeptoren eine Änderung der Sequenz
10 oder/und einen Ausschluß negativer Rezeptoren des vorhergehenden
Zyklus umfaßt.

15
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen planaren Träger verwendet.

20
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen Träger mit einer Vielzahl von Kanälen verwendet.

25
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 23,
dadurch gekennzeichnet,
daß für einen Synthese/Analytbestimmungszyklus mehrere Träger
verwendet werden.

30
25. Verfahren nach Anspruch 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß die mehreren Träger in unterschiedlichen Detektionsvorrich-
tungen synthetisiert und analysiert werden, die informationstechnisch
miteinander verknüpft sind, jedoch voneinander räumlich getrennt
sein können.

- 51 -

26. Träger für die Bestimmung von Analyten umfassend eine Vielzahl von Kanälen, insbesondere Kapillarkanälen, wobei in den Kanälen eine Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptoren immobilisiert ist.

5 27. Träger nach Anspruch 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß er zumindest im Bereich der Reaktionsbereiche optisch
transparent ist.

10 28. Reagenzienkit umfassend einen Träger nach Anspruch 26 oder 27 und Bausteine für die Synthese polymerer Rezeptoren auf dem Träger.

15 29. Vorrichtung zur integrierten Synthese und Analytbestimmung an einem Träger umfassend eine programmierbare Lichtquellenmatrix, eine Detektormatrix, einen zwischen Lichtquellen- und Detektormatix angeordneten Träger sowie Mittel zur Zufuhr von Fluids in den Träger und zur Ableitung von Fluids aus dem Träger.

20 30. Vorrichtung nach Anspruch 29 weiterhin umfassend Mittel zur Entschützung von Reaktionskomponenten auf den Träger.

25 31. Vorrichtung nach Anspruch 29 oder 30 weiterhin umfassend elektronische Steuerungs- und Regelungsmittel.

32. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 25, des Trägers nach Anspruch 26 oder 27, des Reagenzienkits nach Anspruch 28 oder der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 29 bis 31 zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe.

30 33. Verwendung nach Anspruch 32 zur Sequenzierung von Nukleinsäuren.

- 52 -

34. Verwendung nach Anspruch 33 zur Neusequenzierung oder/und Resequenzierung von komplexen genetischem Material, wie etwa individueller Genome oder synthetischen Nukleinsäuren.
- 5 35. Verwendung nach Anspruch 32 zur Gewinnung diagnostischer Informationen für die individuelle Patientenversorgung wie etwa die individuelle Wirkung von Pharmaka.
- 10 36. Verwendung nach Anspruch 32 zur Wirkungsanalyse pharmakologischer Substanzen.
37. Verwendung nach Anspruch 32 zur Erstellung und Analyse von Substanzbibliotheken.
- 15 38. Verwendung nach Anspruch 32 zum Vergleich von Individuen in einer Population.

1 / 4

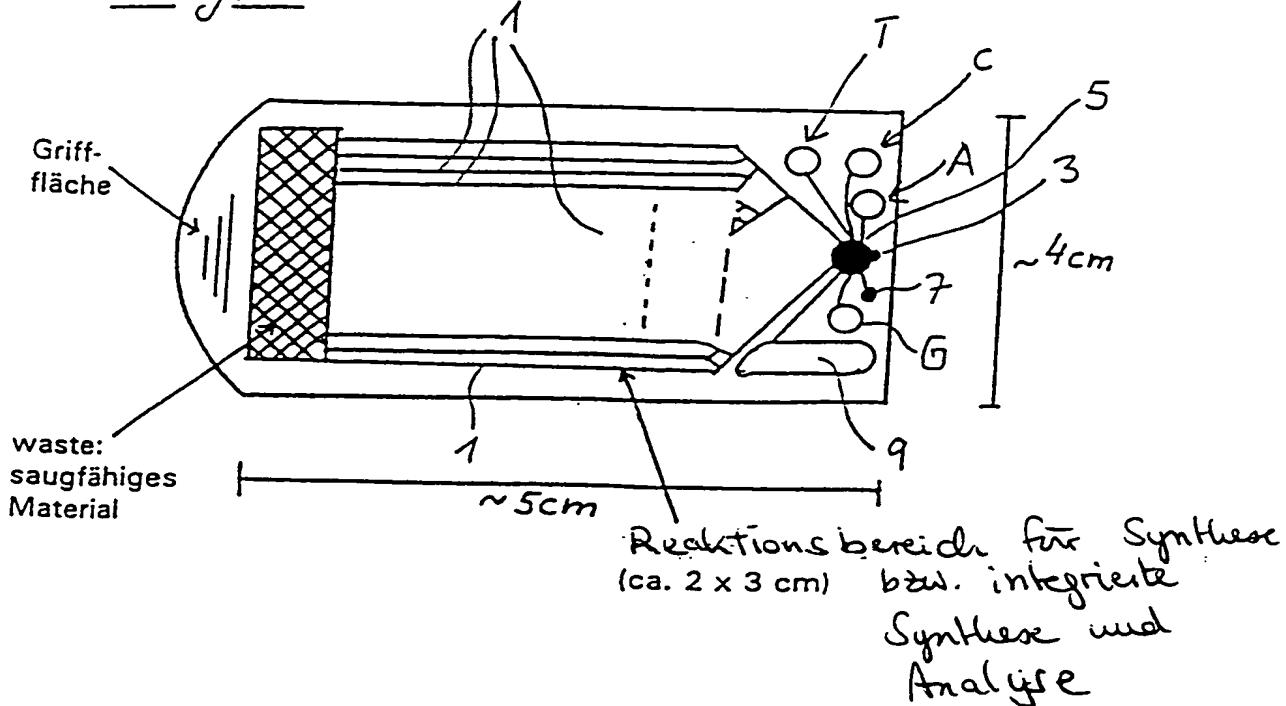
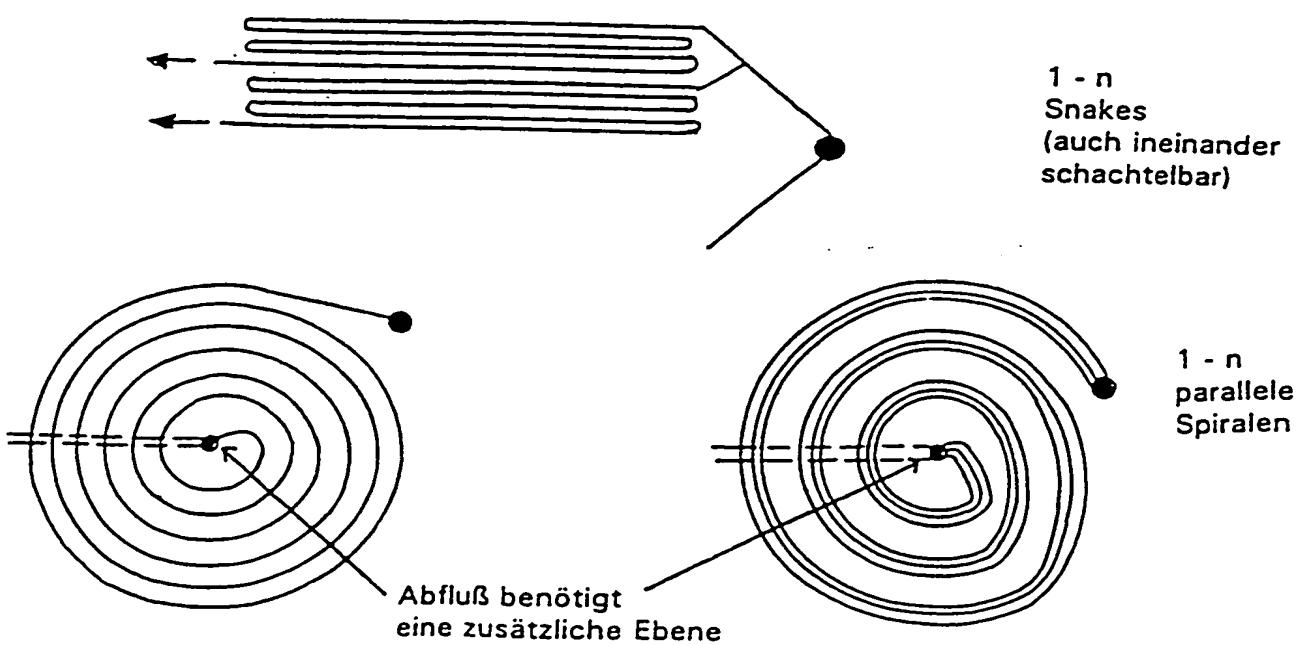
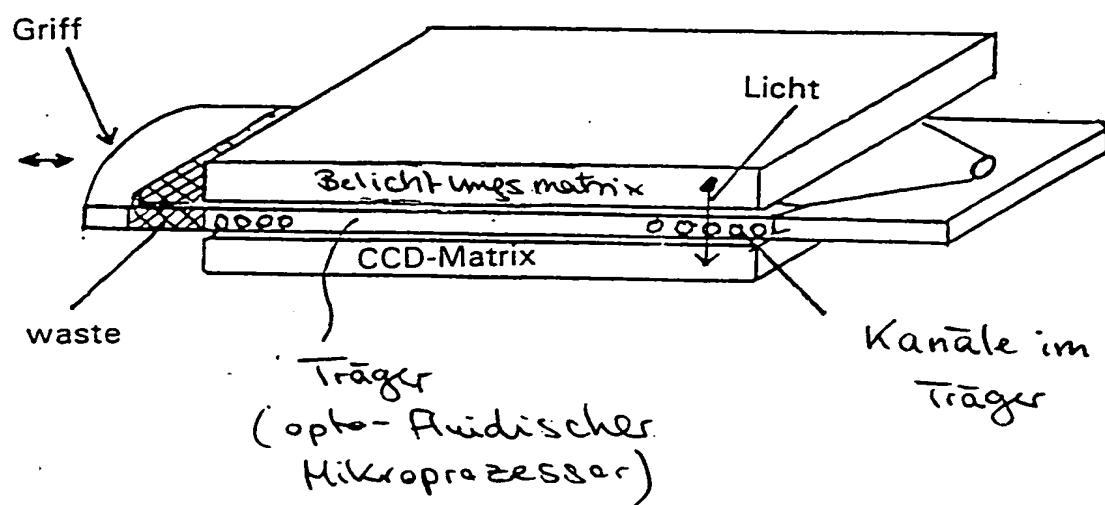
Fig. 1Fig. 2

Fig. 3

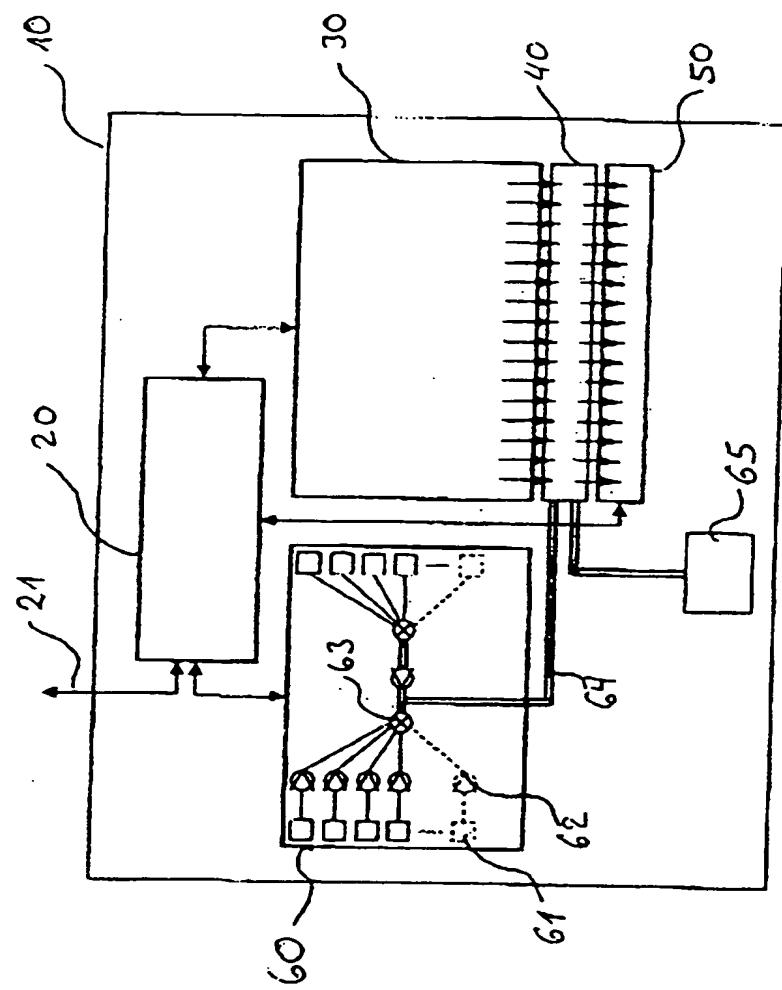
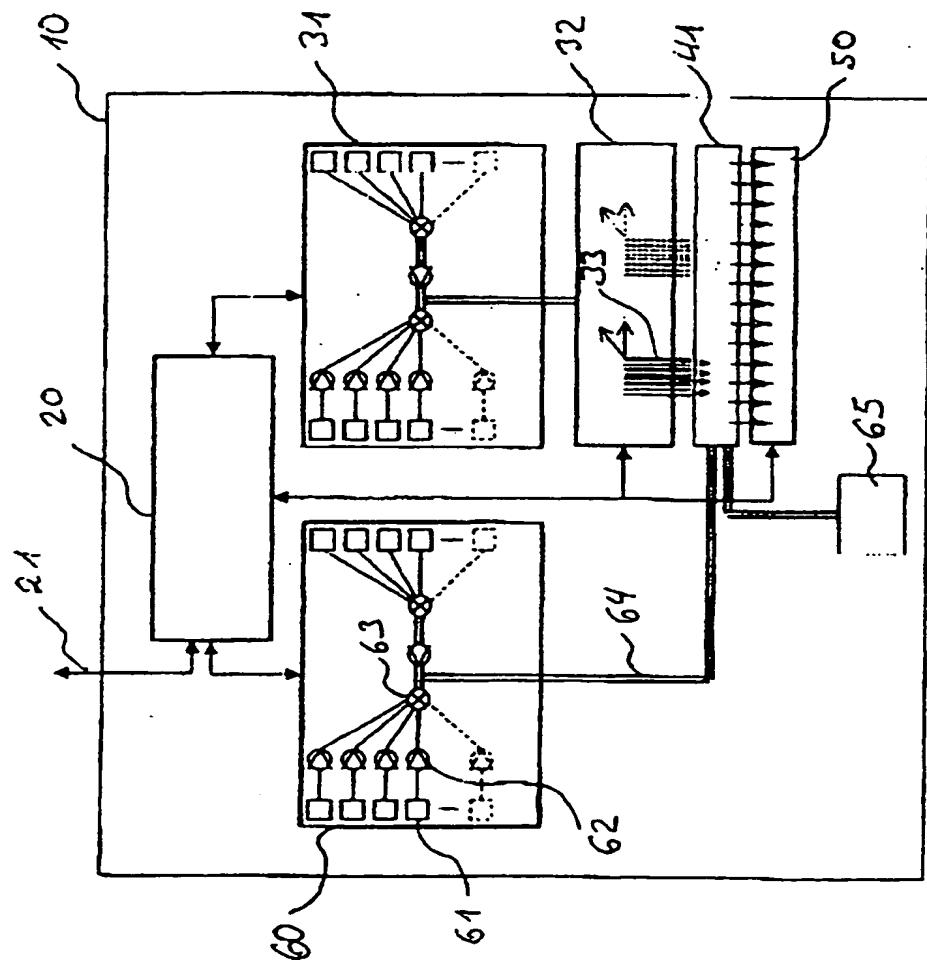


Fig. 4

Fig. 5



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

25. SEP. 2000

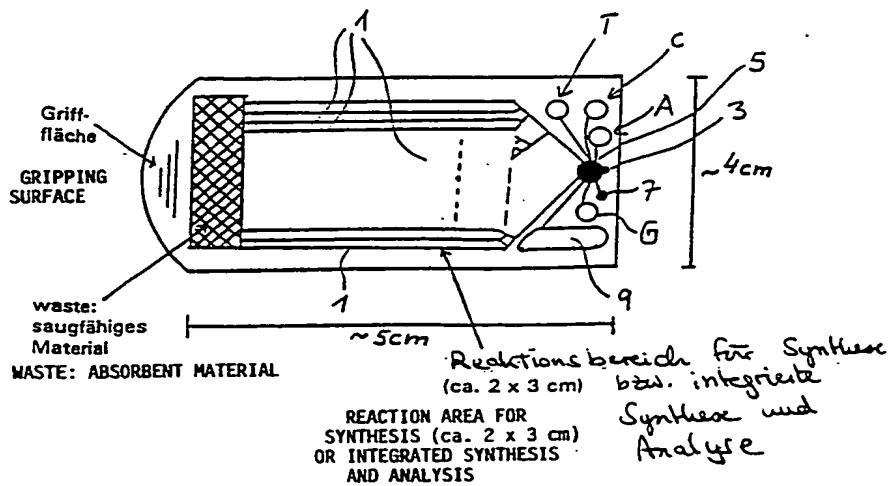


FEBIT
19104120

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : B01J 19/00, C07H 21/00, C07K 1/04	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/13018 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. März 2000 (09.03.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06317		(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 27. August 1999 (27.08.99)		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Prioritätsdaten: 198 39 256.7 28. August 1998 (28.08.98) DE 198 39 254.0 28. August 1998 (28.08.98) DE 198 39 255.9 28. August 1998 (28.08.98) DE 199 07 080.6 19. Februar 1999 (19.02.99) DE 199 24 327.1 27. Mai 1999 (27.05.99) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Gässelweg 15, D-69469 Weinheim (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- richts: 14. September 2000 (14.09.00)
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): STÄHLER, Cord, F. [DE/DE]; Siegfriedstrasse 9, D-69469 Weinheim (DE). STÄHLER, Peer, F. [DE/DE]; Riedfeldstrasse 3, D-68169 Mannheim (DE). MÜLLER, Manfred [DE/DE]; Reuter- strasse 76/b, D-80689 München (DE). STÄHLER, Fritz [DE/DE]; Gässelweg 15, D-69469 Weinheim (DE). LINDNER, Hans [DE/DE]; Vierreichweg 27, D-70569 Stuttgart (DE).		

(54) Title: SUPPORT FOR A METHOD FOR DETERMINING AN ANALYTE AND A METHOD FOR PRODUCING THE SUPPORT

(54) Bezeichnung: TRÄGER FÜR ANALYTBESTIMMUNGSVERFAHREN UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG DES TRÄGERS



(57) Abstract

The invention relates to a support (40) for a method for determining analytes comprising a multitude of channels (1), especially capillary channels. A multitude of different receptors is immobilized in the channels (1) by, in particular, exposure to light. The invention also relates to a method for producing such a support. The support (40) also preferably comprises reservoirs (T, G, A, C) for the individual feed materials, a gas inlet (3), a valve (5), a sample feed (7) and an entrance (9) for additional synthesis chemicals.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein Träger (40) für Analytbestimmungsverfahren angegeben, umfassend eine Vielzahl von Kanälen (1), insbesondere Kapillarkanälen, wobei in den Kanälen (1) eine Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptoren insbesondere durch Belichtung immobilisiert ist. Ferner wird ein Verfahren zur Herstellung eines solches Trägers beschrieben. Der Träger (40) umfasst vorzugsweise auch Reservoirs (T, G, A, C) für die einzelnen Einsatzstoffe, ein Gaseinlass (3), ein Ventil (5), eine Probeneingabe (7) und ein Zugang (9) für weitere Synthesechemikalien.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intel 1st Application No
PCT/EP 99/06317

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 B01J19/00 C07H21/00 C07K1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 B01J C07H C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 723 320 A (PETER J. DEHLINGER) 3 March 1998 (1998-03-03) the whole document ---	1-6,13
A	WO 97 19749 A (PETER J. DEHLINGER) 5 June 1997 (1997-06-05) abstract page 4, line 12 -page 6, line 17 figures ---	1-8,13
X	US 5 755 942 A (PETER JOHN ZANZUCCHI ET AL.) 26 May 1998 (1998-05-26) abstract column 2, line 22 -column 3, line 7 column 10, line 6 - line 43 example 3 figures ---	14,15, 22,23

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 April 2000

Date of mailing of the international search report

11.05.00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stevnsborg, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/06317

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 677 195 A (JAMES A. WINKLER ET AL.) 14 October 1997 (1997-10-14) abstract column 1, line 67 -column 2, line 7 column 2, line 32 - line 62	14
A	column 9, line 6 - line 58 column 26, line 19 -column 27, line 60 ---	1-9,12, 13,15-25
A	WO 96 10747 A (ABBOTT LABORATORIES) 11 April 1996 (1996-04-11) abstract	1
A	WO 95 01559 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH) 12 January 1995 (1995-01-12) ---	
A	J. D. HOHEISEL : "Oligomer-chip technology" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY., vol. 15, no. 11, November 1997 (1997-11), pages 465-469-469, XP004092669 ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE., GB ISSN: 0167-7799 cited in the application the whole document ---	1
A	WO 98 13683 A (SARNOFF CORPORATION) 2 April 1998 (1998-04-02) abstract page 1, line 13 -page 2, line 8 page 5 page 7, line 20 -page 10, line 6 figures ---	14-25
A	US 5 545 531 A (RICHARD P. RAVA ET AL.) 13 August 1996 (1996-08-13) the whole document -----	14-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/06317**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

Due to the findings of the preliminary examination, all additional fees are to be refunded in accordance with PCT Rule 40.2(e).

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-25

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest



The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/06317

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1-13

Method for producing a support for determining analytes comprising the following steps: (a) preparing a support body having at least one channel; (b) conducting liquid with structural elements for the synthesis of polymeric receptors through the channel or the channels of the support body; (c) location-specific and/or time-specific immobilization of the receptor structural elements at predetermined positions located in the channel or in the channels, and; (d) repeating steps (b) and (c) until the desired receptors have been synthesized at the predetermined positions.

2. Claims Nos. 14-25

Method for carrying out the integrated synthesis and determination of analytes on a support comprising the following steps: (a) preparing a support body; (b) conducting a liquid with receptors or structural elements contained therein for the synthesis of polymeric receptors over the support body; (c) location-specific and/or time-specific immobilization of the receptors or receptor structural elements at predetermined positions located on the support; (d) optionally repeating steps (b) and (c) until the desired receptors have been synthesized at predetermined positions located on the support; (e) bringing the support into contact with a sample containing analytes, and; (f) determining the analytes from their binding to the receptors immobilized on the support.

3. Claims Nos. 26-28

Support for determining analytes comprising a multitude of channels, whereby a multitude of different receptors is immobilized in said channels.

4. Claims Nos. 29-38

Device for carrying out the integrated synthesis and determination of analytes on a support comprising a programmable light source matrix, a detector matrix, a support arranged between the light source matrix and the detector matrix, as well as means for feeding fluid into the support and for carrying fluid away from said support.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/06317

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 5723320	A	03-03-1998	US	5759779 A	02-06-1998
WO 9719749	A	05-06-1997	US	5759779 A	02-06-1998
			US	5763263 A	09-06-1998
			AU	7731196 A	19-06-1997
			CA	2238303 A	05-06-1997
			EP	0876206 A	11-11-1998
US 5755942	A	26-05-1998	US	5585069 A	17-12-1996
			AU	705351 B	20-05-1999
			AU	4152396 A	06-06-1996
			AU	705659 B	27-05-1999
			AU	4233796 A	06-06-1996
			CA	2204912 A	23-05-1996
			CA	2205066 A	23-05-1996
			EP	0791238 A	27-08-1997
			EP	0808456 A	26-11-1997
			JP	11500602 T	19-01-1999
			WO	9615450 A	23-05-1996
			WO	9615576 A	23-05-1996
			US	5681484 A	28-10-1997
			US	5643738 A	01-07-1997
			US	5593838 A	14-01-1997
			US	5846396 A	08-12-1998
			US	5985119 A	16-11-1999
			US	5863708 A	26-01-1999
			US	5858804 A	12-01-1999
US 5677195	A	14-10-1997	US	5384261 A	24-01-1995
			US	5412087 A	02-05-1995
			US	6040193 A	21-03-2000
			AU	675054 B	23-01-1997
			AU	3148193 A	15-06-1993
			CA	2124087 A	27-05-1993
			EP	0624059 A	17-11-1994
			EP	0916396 A	19-05-1999
			EP	0972564 A	19-01-2000
			JP	7506561 T	20-07-1995
			WO	9309668 A	27-05-1993
			US	5885837 A	23-03-1999
			AU	4110793 A	29-11-1993
			WO	9322680 A	11-11-1993
WO 9610747	A	11-04-1996	US	5707799 A	13-01-1998
			CA	2195875 A	11-04-1996
			EP	0783694 A	16-07-1997
			JP	10506991 T	07-07-1998
			US	5952173 A	14-09-1999
WO 9501559	A	12-01-1995	DE	59405534 D	30-04-1998
			EP	0706646 A	17-04-1996
WO 9813683	A	02-04-1998	US	5854684 A	29-12-1998
			US	5872623 A	16-02-1999
			AU	4607197 A	17-04-1998
US 5545531	A	13-08-1996	US	5874219 A	23-02-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

II. Nationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/06317

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 B01J19/00 C07H21/00 C07K1/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 B01J C07H C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 723 320 A (PETER J. DEHLINGER) 3. März 1998 (1998-03-03) das ganze Dokument ---	1-6, 13
A	WO 97 19749 A (PETER J. DEHLINGER) 5. Juni 1997 (1997-06-05) Zusammenfassung Seite 4, Zeile 12 -Seite 6, Zeile 17 Abbildungen ---	1-8, 13
X	US 5 755 942 A (PETER JOHN ZANZUCCHI ET AL.) 26. Mai 1998 (1998-05-26) Zusammenfassung Spalte 2, Zeile 22 -Spalte 3, Zeile 7 Spalte 10, Zeile 6 - Zeile 43 Beispiel 3 Abbildungen ---	14, 15, 22, 23 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Nutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. April 2000

Absendedatum des internationalen Rechercheberichts

11.05.00

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stevnsborg, N

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/06317

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 677 195 A (JAMES A. WINKLER ET AL.) 14. Oktober 1997 (1997-10-14) Zusammenfassung Spalte 1, Zeile 67 - Spalte 2, Zeile 7 Spalte 2, Zeile 32 - Zeile 62	14
A	Spalte 9, Zeile 6 - Zeile 58 Spalte 26, Zeile 19 - Spalte 27, Zeile 60 ---	1-9, 12, 13, 15-25
A	WO 96 10747 A (ABBOTT LABORATORIES) 11. April 1996 (1996-04-11) Zusammenfassung ---	1
A	WO 95 01559 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH) 12. Januar 1995 (1995-01-12) ---	
A	J. D. HOHEISEL : "Oligomer-chip technology" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY., Bd. 15, Nr. 11, November 1997 (1997-11), Seiten 465-469-469, XP004092669 ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE., GB ISSN: 0167-7799 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1
A	WO 98 13683 A (SARNOFF CORPORATION) 2. April 1998 (1998-04-02) Zusammenfassung Seite 1, Zeile 13 - Seite 2, Zeile 8 Seite 5 Seite 7, Zeile 20 - Seite 10, Zeile 6 Abbildungen ---	14-25
A	US 5 545 531 A (RICHARD P. RAVA ET AL.) 13. August 1996 (1996-08-13) das ganze Dokument -----	14-25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

Aufgrund des Ergebnisses der vorläufigen Überprüfung
gemäß Regel 40.2(e) PCT sind keine zusätzlichen Gebühren zu erstatte.

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
1-25

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p>Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:</p> <p>1. Ansprüche: 1-13</p> <p>Verfahren zur Herstellung eines Trägers für die Bestimmung von Analyten, umfassend die Schritte von (a) Bereitstellen eines Trägerkörpers umfassend mindestens einen Kanal; (b) Leiten von Flüssigkeit mit Bausteinen für die Synthese polymere Rezeptoren durch den Kanal oder die Kanäle des Trägerkörpers; (c) orts- oder/und zeitspezifisches Immobilisieren der Rezeptorbausteine an jeweils vorbestimmten Positionen in dem Kanal oder in den Kanälen; und (d) Wiederholen der Schritte (b) und (c) bis die gewünschten Rezeptoren an den jeweils vorbestimmten Positionen synthetisiert worden sind.</p> <p>2. Ansprüche: 14-25</p> <p>Verfahren zur integrierten Synthese und Analytbestimmung an einem Träger umfassend die Schritte von (a) Bereitstellen eines Trägerkörpers; (b) Leiten einer Flüssigkeit mit darin enthaltenen Rezeptoren oder Bausteinen für die Synthese von polymeren Rezeptoren über den Träger; (c) orts- oder/und zeitspezifisches Immobilisieren der Rezeptoren oder Rezeptorbausteinen an jeweils vorbestimmten ositionen auf dem Träger; (d) gegebenfalls Wiederholen der Schritte (b) und (c) bis die gewünschten Rezeptoren an den jeweils vorbestimmten Positionen auf dem Träger synthetisiert worden sind; (e) Inkontaktbringen des Trägers mit einer Analyten enthaltenen Probe; und (f) Bestimmen der Analyten über deren Bindung an die auf dem Träger immobilisierten Rezeptoren.</p> <p>3. Ansprüche: 26-28</p> <p>Träger für die Bestimmung von Analyten umfassend eine Vielzahl von Kanälen, wobei in den Kanälen eine Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptoren immobilisiert ist.</p> <p>4. Ansprüche: 29-38</p> <p>Vorrichtung zur integrierten Synthese und Analytbestimmung an einem Träger umfassend eine programmierbare Lichtquellenmatrix, eine Detektormatrix, einen zwischen Lichtquellen- und Detektormatrix angeordneten Träger sowie Mittel zur Zuführ von Fluids in den Träger und zur Ableitung von Fluids aus dem Träger.</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06317

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5723320	A	03-03-1998	US	5759779 A		02-06-1998
WO 9719749	A	05-06-1997	US	5759779 A		02-06-1998
			US	5763263 A		09-06-1998
			AU	7731196 A		19-06-1997
			CA	2238303 A		05-06-1997
			EP	0876206 A		11-11-1998
US 5755942	A	26-05-1998	US	5585069 A		17-12-1996
			AU	705351 B		20-05-1999
			AU	4152396 A		06-06-1996
			AU	705659 B		27-05-1999
			AU	4233796 A		06-06-1996
			CA	2204912 A		23-05-1996
			CA	2205066 A		23-05-1996
			EP	0791238 A		27-08-1997
			EP	0808456 A		26-11-1997
			JP	11500602 T		19-01-1999
			WO	9615450 A		23-05-1996
			WO	9615576 A		23-05-1996
			US	5681484 A		28-10-1997
			US	5643738 A		01-07-1997
			US	5593838 A		14-01-1997
			US	5846396 A		08-12-1998
			US	5985119 A		16-11-1999
			US	5863708 A		26-01-1999
			US	5858804 A		12-01-1999
US 5677195	A	14-10-1997	US	5384261 A		24-01-1995
			US	5412087 A		02-05-1995
			US	6040193 A		21-03-2000
			AU	675054 B		23-01-1997
			AU	3148193 A		15-06-1993
			CA	2124087 A		27-05-1993
			EP	0624059 A		17-11-1994
			EP	0916396 A		19-05-1999
			EP	0972564 A		19-01-2000
			JP	7506561 T		20-07-1995
			WO	9309668 A		27-05-1993
			US	5885837 A		23-03-1999
			AU	4110793 A		29-11-1993
			WO	9322680 A		11-11-1993
WO 9610747	A	11-04-1996	US	5707799 A		13-01-1998
			CA	2195875 A		11-04-1996
			EP	0783694 A		16-07-1997
			JP	10506991 T		07-07-1998
			US	5952173 A		14-09-1999
WO 9501559	A	12-01-1995	DE	59405534 D		30-04-1998
			EP	0706646 A		17-04-1996
WO 9813683	A	02-04-1998	US	5854684 A		29-12-1998
			US	5872623 A		16-02-1999
			AU	4607197 A		17-04-1998
US 5545531	A	13-08-1996	US	5874219 A		23-02-1999